



Réponse au parasitisme par des guêpes chez la drosophile : rôle de la voie de signalisation Toll/NFkB

Isabelle Louradour

► To cite this version:

Isabelle Louradour. Réponse au parasitisme par des guêpes chez la drosophile : rôle de la voie de signalisation Toll/NFkB. Biologie animale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30256 . tel-01380589

HAL Id: tel-01380589

<https://theses.hal.science/tel-01380589>

Submitted on 13 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Isabelle Louradour

le 23 octobre 2015

Titre :

Réponse au parasitisme par des guêpes chez la drosophile : rôle de la voie de signalisation Toll/NFκB

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Biologie du développement

Unité de recherche :

Centre de Biologie du Développement, UMR5547

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Nathalie Vanzo, CR1

Dr. Michèle Crozatier, DR2

Jury :

Pr. David Cribbs, président du jury

Dr. Jonathan Ewbank, DR1, rapporteur

Pr. Bruno Lemaître, rapporteur

Pr. Marylène Poirié, rapportrice

Glossaire

Ado	Adénosine
Adgf-A	Adenosine Growth Factor A
AGM	Aorte-Gonade-Mésonephros
Ago2	Argonaute
Ang-1	Angiopoïétine
AMP	Peptide AntiMicrobien
Antp	Antennapedia
ARNm	ARN messenger
BC	Black Cell
Bip	Bric à bras interacting protein 1
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR1	Bone Morphogenetic Protein Receptor 1
CAR	cellule Réticulaire Abondante en CXCL12
CG	Corps Gras
CI	Cubitus Interruptus
CLP	Progéniteur Lymphoïde Commun
CMP	Progéniteur Myéloïde Commun
Col	Collier
CrPV	Cricket Paralysis Virus
CSH	Cellule Souche Hématopoïétique
DAMP	Danger-Associated Molecular Pattern
DCV	Drosophila C Virus
Dilp	Drosophila insulin like peptid
Dpp	Decapentaplegic
Dfzl2	D-Frizzled2
DKK	Dickkopf homologue 1
Dome	Domeless
DUOX	Dual Oxidase
EBF	Early B-Cell Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
eL3	début de 3ème stade larvaire
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGF-R	Fibroblast Growth Factor Receptor
FHV	Flock House Virus
FOG	Friend Of GATA
GABA	acide γ -aminobutyrique
Gcm	Glial cells Missing
G-CSF	Granulocyte Colny Stimulating Factor
GL	Glande Lymphatique
GMP	Progéniteur Granulocyte/Macrophage
GNBP	Gram Negative Binding Protein
Heix	Heixuedan
Hh	Hedgehog
Hop	Hopscotch
IFN	Interféron
IkB	Inhibitor of NF κ B
IKK	IkB Kinase
IL-1	Interleukine 1
IMD	Immune deficiency
InsR	Récepteur à l'insuline
Ins/TOR	Insuline/Target Of Rapamycin
IPC	Insulin-Producing Cell
L1/L2	1er/2ème stade larvaire
LB	Lymphocyte B
LCM	Laser Capture Microdissection
LPS	Lipopolysaccharide
Lz	Lozenge
LT	Lymphocyte T
LT-CSH	Long Term Hematopoietic Stem Cell
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MMP	Métalloprotéase de la matrice
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MEP	Progéniteur Mégakaryocyte/Erythrocyte

mL3	milieu de 3ème stade larvaire
MSC	Cellule Souche Mésenchymateuse
Msn	Misshapen
MO	Moëlle Osseuse
N	Notch
NK	Natural Killer
NF κ B	Nuclear Factor κ B
Nup98	Nucleoporine 98
Odd	Oddskipped
PABP	PolyA Binding Protein
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PGRP	PeptidoGlycan Receptor Protein
PO	PhénolOxydase
PPO	ProPhénolOxydase
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSC	Centre de Signalisation Postérieur
Puff	Puffy eye
Pvf1	PDGF and VEGF related factor1
Pvr	PDGF and VEGF related receptor
RISC	RNA Induces Silencing Complex
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
RVFV	Rift Valley Fever Virus
SCF	Stem Cell Factor
SDF1	Stroma Derived Factor 1
SFRP1	Secreted Frizzled-Related Protein 1
SFV	Semliki Forrest Virus
SHh	SonicHedgehog
siRNA	small interferent RNA
Ser	Serrate
SERCA	Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
Slif	Slimfast
SNP	Système Nerveux Périphérique
SP	Sérine Protéase
Spi	Spitz
Spz	Spätzle
SOD	SuperOxide Dismutase
Srp	Serpent
ST-CSH	Short Term Hematopoietic Stem Cell
Su(H)	Suppressor of Hairless
TCR	T Cell Receptor
tep4	thioester-containing protein 4
THP	Tissu Hématopoïétique Postérieur
TLR	Toll Like Receptor
TPO	Thrombopoïétine
Trol	Terribly Reduced Optic Lobes
Upd	Unpaired
Ush	U-Shaped
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLP	Virus Like Particule
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
Wg	Wingless
Wnt	Wint
ZC	Zone corticale
Zfrp8	Zinc Finger Protein RP8
ZI	Zone Intermédiaire
ZM	Zone Médullaire

INTRODUCTION	1
<u>I. Hématopoïèse et système sanguin</u>	<u>3</u>
A) L'hématopoïèse chez les mammifères	5
1) Les cellules sanguines des mammifères	6
a) Le lignage myéloïde	6
b) Le lignage lymphoïde	6
2) Ontogenèse du système hématopoïétique	9
a) Qu'est-ce qu'une Cellule Souche Hématopoïétique ?	9
b) Origine et migration des CSHs	9
B) L'hématopoïèse chez la drosophile	13
1) Les cellules sanguines / immunitaires de la drosophile	15
a) Les plasmatocytes	15
b) Les cellules à cristaux	16
c) Les lamellocytes	16
2) L'hématopoïèse embryonnaire	19
3) L'hématopoïèse larvaire	21
a) L'ontogenèse de la Glande Lymphatique (GL)	21
b) La GL au stade mL3	23
c) Les compartiments sessiles larvaires et adultes	25
4) Les nœuds hématopoïétiques de la drosophile adulte	29
<u>II. La régulation de l'hématopoïèse</u>	<u>31</u>
A) Chez les mammifères adultes	31
1) En absence d'infection	31
a) La niche endostéale	31
b) La niche vasculaire	33
c) Les autres acteurs du contrôle de l'hématopoïèse	35
2) En réponse à un stress hématopoïétique	37
a) La réponse de la (des) niche(s) hématopoïétique(s)	37
b) Les facteurs de transcription NFκB et l'inflammation / la réponse immunitaire	41
B) Chez la drosophile : dans la GL	47
1) Le PSC : centre de contrôle de l'hématopoïèse dans la GL	47
2) Le contrôle intrinsèque de l'homéostasie de la GL par les Zones Médullaire et Corticale (ZM et ZC)	50
3) Les acteurs extrinsèques du contrôle de l'hématopoïèse de la GL	53
<u>III. La réponse immunitaire chez la drosophile</u>	<u>55</u>
A) L'immunité humorale	57
1) La réponse antibactérienne et antifongique	57
2) La réponse antivirale	63
B) L'immunité cellulaire	67
1) La phagocytose	67
2) La mélanisation	69

3) L'encapsulation	71
C) Le cas du parasitisme par des guêpes	73
1) Le cycle de vie de la guêpe parasitoïde <i>Leptopilina boulardi</i>	75
2) La réponse immunitaire au parasitisme	76
3) Le contournement de la réponse immunitaire de la drosophile par le pathogène.....	79
4) Le contrôle de la réponse au parasitisme	83
a) Le métabolisme	83
b) La voie JAK/STAT.....	83
c) Les ROS et la voie EGFR	87
d) La voie Notch.....	87
e) La voie Toll/NFκB	88
RESULTATS	91
<u>I. La voie Toll/NFκB via Dif contrôle la dispersion de la GL suite à un parasitisme par de guêpes</u>	<u>93</u>
A) Résumé	93
B) Article.....	95
<u>II. La voie JAK/STAT et la réponse de la GL au parasitisme par des guêpes</u>	<u>131</u>
A) La voie JAK/STAT contrôle la dispersion de la GL	131
B) Existe-t-il un lien fonctionnel entre Dif et la voie JAK/STAT dans la GL lors de la réponse au parasitisme ?.....	137
C) Conclusions	140
<u>III. Etablissement du transcriptome des cellules du PSC : adaptation de la technique de « TU-tagging » .</u>	<u>141</u>
A) Principe.....	143
B) Méthodologie.....	145
C) Résultats.....	147
1) Trouver des conditions de « TU-tagging » ne modifiant pas l'homéostasie de la GL	147
2) Vérifier de la présence d'ARNs marqués dans la GL.....	149
3) Tester la spécificité du marquage des ARNs	151
a) Spécificité de la rétention sur des billes	151
b) Spécificité du « TU-tagging » des ARNs du PSC	155
D) Conclusion	157
<u>IV. Résultats complémentaires.....</u>	<u>159</u>
A) Contrôle de la « niche hématopoïétique » de la drosophile par le système vasculaire : rôle de la signalisation Slit/Robo	159
1) Résumé	159
2) Article.....	161
B) Article de vulgarisation : la « niche hématopoïétique » de la drosophile, un modèle d'étude <i>in vivo</i> du microenvironnement contrôlant les CSHs	201
DISCUSSION	209
<u>I. Contrôle de la dispersion de la GL après parasitisme par des guêpes</u>	<u>211</u>

A) Un réseau génétique complexe contrôle la dispersion de la GL	211
B) Le PSC est-il le seul acteur du contrôle de la dispersion des GLs ?	213
C) Processus moléculaires impliqués dans la dispersion de la GL après parasitisme	215
<u>II. Etablissement du transcriptome du PSC après parasitisme</u>	<u>217</u>
<u>III. La GL est-elle le site majeur de production des lamellocytes après parasitisme ?</u>	<u>219</u>
A) Quelle est la contribution de la GL à la production globale de lamellocytes ?	219
B) Le PSC contrôle-t-il l'homéostasie des hémocytes présents dans la circulation lymphatique ?	221
<u>IV. Conclusion.....</u>	<u>222</u>
MATERIEL ET METHODES	223
<u>I. Parties résultats I et II</u>	<u>225</u>
<u>II. Partie résultats III.....</u>	<u>226</u>
BIBLIOGRAPHIE	229
REMERCIEMENTS	245

Introduction

Introduction

I. Hématopoïèse et système sanguin

L'hématopoïèse est le processus permettant la formation de toutes les cellules sanguines, c'est-à-dire pour les vertébrés les cellules permettant le transport de l'oxygène (érythrocytes ou « globules rouges ») ; et les cellules dédiées à la défense de l'organisme (cellules immunitaires ou « globules blancs »). Ce processus est crucial pour la survie des organismes. Les cellules sanguines constituent en effet un mécanisme essentiel contre les attaques extérieures. Elles permettent l'identification et la destruction de ce qui est étranger au corps, le « non-soi », pour mieux préserver ce qui en fait partie, le « soi ». Un défaut de production de ces cellules peut avoir de graves conséquences, puisqu'il entraîne l'incapacité de se défendre contre les organismes pathogènes, qui vont alors se développer au détriment de l'hôte.

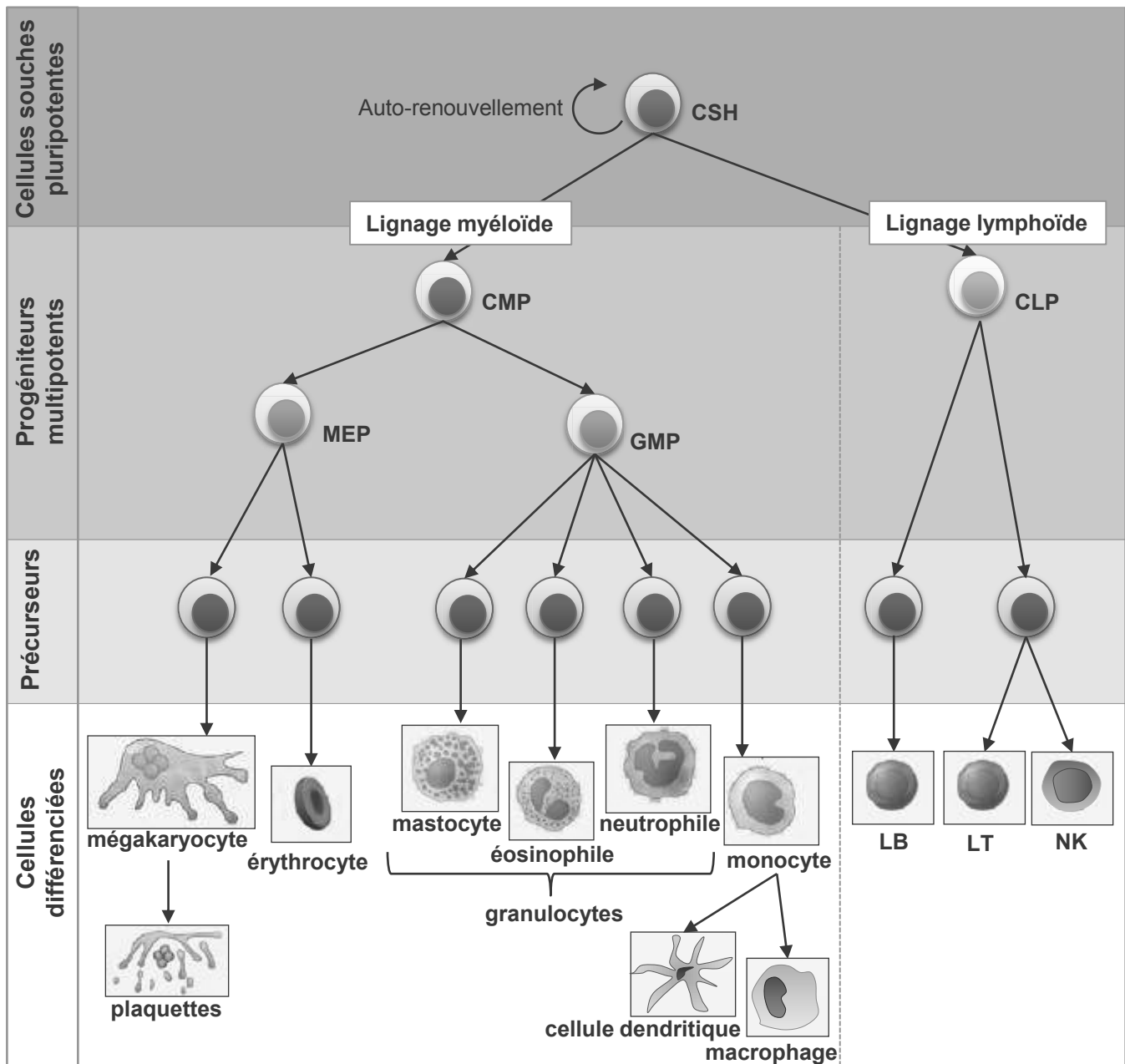


Figure 1 : Le système hématopoïétique des mammifères

Chez les mammifères adultes, les Cellules Souches Hématopoïétiques (CSHs) sont à l'origine de l'ensemble des cellules du compartiment hématopoïétique, par des étapes successives de différenciation. Les CSH génèrent deux types de progéniteurs distincts: les progéniteurs myéloïdes (CMPs) et les progéniteurs lymphoïdes (CLPs). L'ensemble des cellules du lignage myéloïde, impliqué majoritairement dans la réponse immunitaire innée, va être produit à partir des CMPs tandis que les CLPs vont permettre la formation de toutes les cellules lymphoïdes, responsables de la réponse immunitaire adaptative.
(adapté de Orkin and Zon, 2008)

A) L'hématopoïèse chez les mammifères

Chez les mammifères adultes, l'hématopoïèse a lieu dans la moëlle osseuse (MO), à partir d'un type unique de cellules appelées Cellules Souches Hématopoïétiques (CSHs). Les CSHs donnent naissance à l'ensemble des cellules du système sanguin, par des étapes successives de différenciation (**Figure 1**). Elles vont en effet exprimer progressivement des marqueurs de différenciation et donner naissance à différents progéniteurs intermédiaires, puis à des cellules sanguines matures et fonctionnelles. Les cellules sanguines des mammifères sont classées en fonction de leur rôle dans l'organisme et du lignage auquel elles appartiennent. Deux lignages hématopoïétiques distincts sont produits à partir des CSHs : 1) les progéniteurs myéloïdes (CMPs pour Common Myeloid Progenitors) vont donner naissance au lignage myéloïde, impliqué principalement dans l'immunité innée, ne faisant pas intervenir d'effet mémoire dans la lutte contre les pathogènes ; 2) les progéniteurs lymphoïdes (CLPs pour Common Lymphoid Progenitors) vont générer les cellules du lignage lymphoïde ou lymphocytes, impliqués dans l'immunité adaptative. Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative met en jeu des mécanismes de mémoire immunitaire, qui permettent une défense adaptée et efficace lors d'une nouvelle rencontre avec un même pathogène.

1) Les cellules sanguines des mammifères

a) Le lignage myéloïde

Le lignage myéloïde est composé de sept types cellulaires distincts (**Figure 1** ; pour revue : (Iwasaki and Akashi, 2007; Orkin, 2000; [niaid.nih.gov/topics/immune system](http://niaid.nih.gov/topics/immune_system)) :

-Les granulocytes, issus d'un progéniteur commun avec les macrophages (progéniteur GMP pour Granulocyte/Macrophage Progenitor), incluent les mastocytes, éosinophiles et neutrophiles. Les neutrophiles représentent la population la plus importante et ont pour fonction principale la phagocytose. Les mastocytes et les éosinophiles sont particulièrement importants lors de la réponse anti-parasitaire. Ils sécrètent des molécules cytotoxiques pour les pathogènes, ou inflammatoires, permettant la communication avec les autres cellules du système hématopoïétique.

-Les macrophages, issus de la maturation des monocytes, sont impliqués dans la phagocytose. Les monocytes génèrent également les cellules dendritiques, qui présentent des antigènes aux lymphocytes.

-Le progéniteur MEP (pour Megakaryocyte/Erythrocyte Progenitor) génère à la fois les mégakaryocytes, dont la désagrégation produit les plaquettes, impliquées dans la coagulation ; et les érythrocytes, permettant le transport de l'oxygène.

Les cellules myéloïdes sont majoritairement impliquées dans l'immunité innée, mais elles contribuent également à la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. En présentant des antigènes aux lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, tous deux issus de la maturation des monocytes, permettent en effet leur activation.

b) Le lignage lymphoïde

Les lymphocytes sont les composants centraux de la réponse immunitaire adaptative. Trois types de cellules composent le lignage lymphoïde (**Figure 1** ; pour revue : (Kondo et al., 2001; niaid.nih.gov/topics/immunesystem) :

-Les lymphocytes B (LB), responsables de la production d'anticorps dirigés contre un pathogène. Outre cette fonction majeure, les LB présentent des antigènes aux lymphocytes T, permettant leur activation.

-Les lymphocytes T (LT), qui naissent dans la moëlle osseuse mais terminent leur maturation dans le thymus. Ils permettent l'élimination de pathogènes après reconnaissance spécifique d'un antigène présent à leur surface et coordonnent la réponse immunitaire. Les LTs reconnaissent les antigènes par un récepteur spécifique appelé TCR (T Cell Receptor) et sont divisés en plusieurs classes.

-Les cellules Natural Killer (NK) contiennent des granules emplies de molécules cytotoxiques. Ces molécules une fois relâchées sont responsables de la mort par apoptose de la cellule cible.

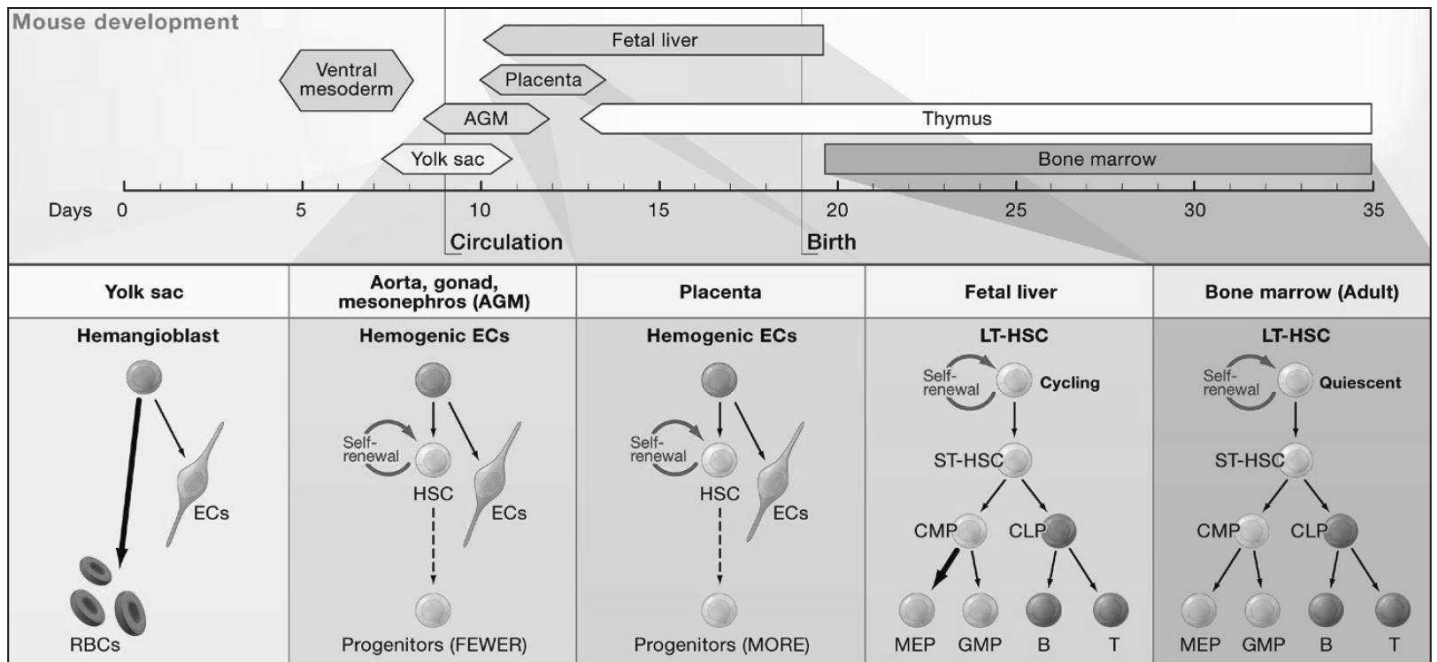


Figure 2 : Origine et migration des Cellules Souches Hématopoïétiques chez la souris

Chez la souris l'hématopoïèse primitive débute au stade embryonnaire E7,5 et permet la formation à partir du sac vitellin d'érythrocytes (Red Blood Cells : RBCs). L'hémangioblaste à partir duquel sont produites ces RBCs génère également des Cellules Endothéliales (EC). Le second site hématopoïétique à se mettre en place, au stade E10,5, est l'Aorte-Gonade-Mésonephros (AGM). Dans la partie ventrale de l'AGM, un endothélium hémogénique va produire à la fois des CSHs et des cellules endothéliales. Les CSHs vont par la suite coloniser plusieurs organes au cours du développement : le placenta, le foie fœtal, le thymus et la rate; et dans un dernier temps la moëlle osseuse, qui reste le seul tissu hématopoïétique chez l'adulte. (Orkin and Zon; 2008)

2) Ontogenèse du système hématopoïétique

De par la multiplicité des types cellulaires, le système hématopoïétique des mammifères est donc extrêmement complexe. Cependant, un seul type de cellules appelé Cellules Souches Hématopoïétiques (CSHs) est à l'origine de l'ensemble des cellules du compartiment sanguin. Comprendre la nature et l'origine de ces CSHs est donc crucial pour appréhender la mise en place du système hématopoïétique.

a) Qu'est-ce qu'une Cellule Souche Hématopoïétique ?

Les CSHs sont capables de s'auto-renouveler, de proliférer et de se différencier pour donner naissance aux différents types cellulaires composants le système sanguin. Ces cellules sont rares et ne représentent que 0,01 à 0,2% des cellules présentes dans la moëlle osseuse de l'homme adulte (Pang et al., 2011). Les CSHs sont définies par leur capacité à reconstituer l'intégralité du système hématopoïétique d'un animal irradié après transplantation (Medvinsky et al., 2011). Aucun marqueur n'est connu pour être spécifiquement exprimé par les CSHs. Certaines combinaisons de marqueurs permettent néanmoins de sélectionner une population de cellules enrichies en CSHs (Challen et al., 2010). Par exemple, les marqueurs c-kit, CD34 et Sca-1 sont exprimés par les CSHs, mais sont aussi partagés avec d'autres types cellulaires (pour revue : (Medvinsky et al., 2011)).

b) Origine et migration des CSHs

L'hématopoïèse chez la souris se déroule en plusieurs phases successives au cours du développement (**Figure 2**; Al-Drees et al., 2015; Medvinsky et al., 2011). La phase initiale est appelée hématopoïèse primitive et débute dans une annexe extra-embryonnaire, le sac vitellin, au niveau d'îlots sanguins. La fonction première de cette vague d'hématopoïèse est la production d'érythrocytes, nécessaires à l'oxygénation au cours du développement de l'embryon. Le premier site hématopoïétique intra-embryonnaire apparaît chez la souris au stade embryonnaire 10, le long de l'aorte dorsale, au niveau des gonades et du mésonephros en formation, appelé Aorte-Gonade-Mesonephros (AGM). L'AGM permet l'émergence des CSHs adultes, à partir d'un endothélium hémogénique localisé dans sa région ventrale. Contrairement aux CSHs produites au cours de l'hématopoïèse primitive,

les CSHs produites à partir de l'AGM vont coloniser la moëlle osseuse, unique site hématopoïétique persistant chez les adultes. La vague d'hématopoïèse initiée à partir de l'AGM s'appelle ainsi hématopoïèse définitive. Au cours du développement, les CSHs produites à partir du sac vitellin lors de l'hématopoïèse primitive et de l'AGM lors de l'hématopoïèse définitive vont coloniser d'autres sites, où elles vont proliférer. Ainsi les CSHs migrent et sont amplifiées dans le placenta, le foie fœtal, le thymus, la rate et enfin la moëlle osseuse. Ces organes interviennent dans l'hématopoïèse, mais ils sont uniquement colonisés par les CSHs et n'en génèrent pas *de novo*. Chez l'adulte, seule la moëlle osseuse assure la production des cellules hématopoïétiques.

Le contrôle génétique de l'hématopoïèse chez les mammifères est complexe et fait intervenir de nombreux facteurs de transcription. En particulier, les facteurs de type GATA, Friend-Of-GATA (FOG) et RUNX sont impliqués à différents stade de l'hématopoïèse. Un complexe formé par GATA 1 et FOG 1 est par exemple requis à la spécification du lignage mégakaryocytes/érythrocytes (Tsang et al., 1998). GATA 2 est impliqué dans le contrôle de la prolifération des CSHs (Shimizu and Yamamoto, 2005) tandis que GATA 3 permet entre autres la différenciation des cellules T helper de type 2 (Zhou and Ono, 2002). Par ailleurs, les trois facteurs RUNX présents chez les mammifères participent à différentes étapes de l'hématopoïèse (Blyth et al., 2005) ; et RUNX1 est connu pour être l'une des cibles les plus fréquentes de translocations chromosomiques à l'origine de leucémies myéloïdes (De Braekeleer et al., 2015). Les translocations chromosomiques génèrent une dérégulation de l'expression de certains gènes et sont fréquemment observés dans différents cancers, en particulier hématopoïétiques.

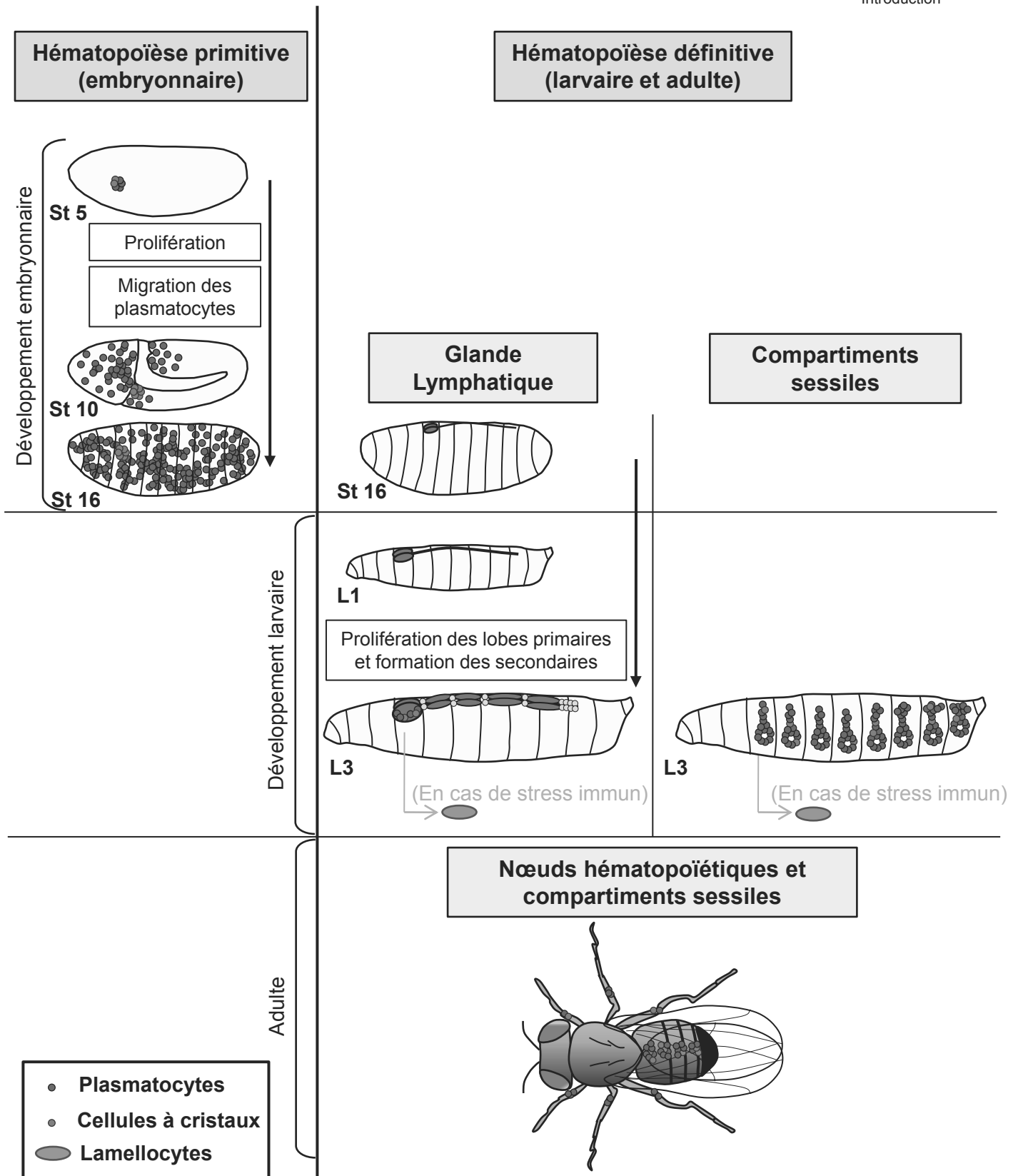


Figure 3 : Les sites hématopoïétiques au cours du développement de la drosophile

Chez la drosophile l'hématopoïèse se déroule en deux phases successives :

- l'hématopoïèse primitive, permettant au stade embryonnaire la production de plasmotocytes et de cellules à cristaux à partir du mésoderme antérieur
- l'hématopoïèse définitive, permettant la production de plasmotocytes et de cellules à cristaux mais aussi de lamellocytes lors d'un stress immunitaire tel que le parasitisme par des guêpes. Plusieurs sites sont impliqués dans l'hématopoïèse définitive : la GL lors du développement larvaire, les compartiments sessiles chez la larve et l'adulte, puis les nœuds hématopoïétiques chez l'adulte.

(adapté de Vlisidou and Wood; 2015)

B) L'hématopoïèse chez la drosophile

Au cours des dernières décennies, la drosophile s'est imposée en tant qu'organisme modèle dans l'étude de l'hématopoïèse. La disponibilité de nombreux outils génétiques et moléculaires chez cet organisme, mais aussi le temps de développement réduit de cet insecte en font en effet une alternative intéressante à l'utilisation de modèles murins. De nombreux gènes et voies de signalisation sont évolutivement conservés entre la drosophile et les mammifères, néanmoins la redondance fonctionnelle entre gènes de la même famille est nettement plus réduite chez la drosophile, ce qui rend plus facile son utilisation en tant que modèle génétique. Comme chez les mammifères, l'hématopoïèse de la drosophile a lieu lors de plusieurs vagues successives au cours du développement (**Figure 3**; Lanot et al., 2001). Une première vague a lieu au stade embryonnaire tandis qu'une deuxième a lieu au stade larvaire, dans un organe spécialisé appelé Glande Lymphatique (GL). La GL n'est pas le seul compartiment hématopoïétique au stade larvaire, de l'hématopoïèse pouvant également avoir lieu au niveau des « compartiments sessiles », groupes de cellules sanguines localisés le long des flancs de la larve (Kurucz et al., 2007; Leitão and Sucena, 2015; Makhijani et al., 2011). Les cellules immunitaires/sanguines produites lors de l'hématopoïèse embryonnaire et larvaire sont ensuite retrouvées chez l'adulte (Holz et al., 2003). Jusqu'à très récemment l'hématopoïèse chez la drosophile adulte a été considérée comme inexistante car aucune production de cellules immunitaires *de novo* n'y avait été observée. Très récemment cependant, S. Ghosh et col. (2015) ont montré que des cellules sanguines peuvent se différencier chez l'adulte, à partir de groupes de cellules présents sous la cuticule de l'abdomen, que les auteurs ont qualifiés de « nœuds hématopoïétiques » (Ghosh et al., 2015 ; cf introduction I-B-4).

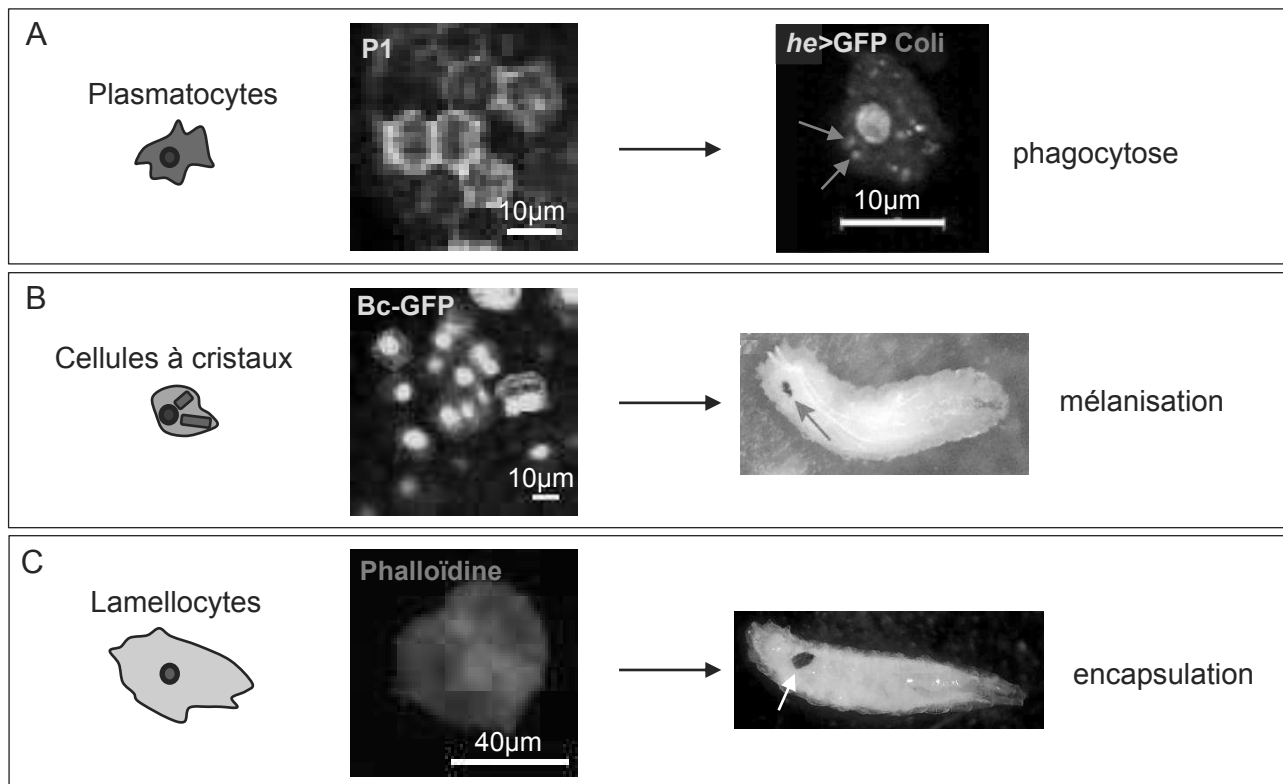


Figure 4 : Les cellules sanguines/immunitaires de la drosophile

Il existe trois types de cellules sanguines/immunitaires chez la drosophile, appelées hémocytes :

- Les plasmatocytes, nécessaires à la phagocytose des pathogènes et débris cellulaires. Sur l'image de gauche, ils sont visualisés à l'aide du marqueur P1, et les noyaux sont marqués par Topro3 (bleu). A droite, un plasmatocyte, marqué par *hemese>GFP* (vert), a phagocyté des bactéries *E. coli*, qui expriment la protéine fluorescente RFP (rouge; flèches rouges; image extraite de Horn et al., 2014).
- Les cellules à cristaux, impliquées dans la mélanisation. Sur l'image de gauche elles sont visualisées grâce à l'expression du transgène Bc-GFP (vert) et les noyaux sont marqués par Topro3 (bleu). A droite, une larve a été piquée à l'aide d'une aiguille stérilisée. Le point de piqûre est mélanisé (flèche; image extraite de De Gregorio et al., 2002).
- Les lamellocytes, requis à l'encapsulation. A gauche, un lamellocyte est marqué par la phalloïdine (rouge), et son noyau par Dapi (bleu). Sur l'image de droite, une larve a été parasitée par la guêpe *Leptopilina boulardi*. L'œuf de guêpe a été encapsulé, et la capsule mélanotique est visible (flèche blanche).

1) Les cellules sanguines / immunitaires de la drosophile

Chez la drosophile il n'existe que trois types de cellules sanguines, que l'on désigne sous le terme d'hémocytes chez les insectes. Ces cellules ont une fonction immunitaire et sont appelées plasmatocytes, cellules à cristaux et lamellocytes (**Figure 4**), tandis que le « sang » de la drosophile porte le nom d'hémolymphe. Les hémocytes se différencient à partir de progéniteurs hématopoïétiques, ou pro-hémocytes, et sont apparentés fonctionnellement au lignage myéloïde des mammifères. Ils sont impliqués dans l'immunité innée. Il n'existe pas d'immunité adaptative chez la drosophile.

a) Les plasmatocytes

Les plasmatocytes représentent environ 95% des hémocytes en circulation au stade larvaire. Ces cellules sphériques d'un diamètre d'environ 10 μm sont apparentées aux monocytes et macrophages des mammifères et ont pour fonctions la sécrétion de la matrice extra-cellulaire (MEC) (Martinek et al., 2008) ainsi que la phagocytose (cf introduction III-B-1). Elles contribuent par ce processus à l'élimination de corps apoptotiques et débris cellulaires, en particulier au stade pupal lors de la métamorphose; et lors d'infections par des pathogènes (**Figure 4-A**).

Outre leur rôle dans la phagocytose, les plasmatocytes sont également impliqués dans la neutralisation de pathogènes par « encapsulation ». L'encapsulation a lieu lorsque le pathogène ou le corps étranger est trop gros pour être phagocyté (cf introduction III-B-3). Les plasmatocytes présents dans l'hémolymphe de la larve sont responsables de la détection du pathogène à encapsuler (Russo et al., 1996) et constituent la première couche cellulaire de la capsule se formant autour de l'intrus.

Enfin, il a été montré un rôle essentiel des plasmatocytes dans la mise en place de la réponse immunitaire humorale, qui implique la production de différents types de molécules solubles, incluant les peptides anti-microbiens (AMPs), nécessaires à la destruction des pathogènes (cf introduction III-A). Les plasmatocytes ne sont pas la source principale d'AMPs, mais sont nécessaires à leur production par le corps gras. L'expression de la Psidine, une protéine lysosomale, est pour cela nécessaire dans les plasmatocytes. En effet, suite à une infection bactérienne, un défaut de

production de l'AMP Défensine par le corps gras est observé dans des larves dans lesquelles l'expression de la Psidine est inhibée dans les plasmatoctes (Brennan et al., 2007). De plus les hémocytes sont la source de Spätzle (Spz), ligand de la voie Toll/NFκB, centrale dans la réponse immunitaire humorale. Lors d'une infection, l'inactivation spécifiquement dans les hémocytes de *spz* entraîne en effet une réduction du niveau d'activation de la voie Toll/NFκB par le corps gras et de la production d'AMPs, démontrant le rôle crucial des plasmatoctes dans l'induction de la réponse immunitaire humorale (Shia et al., 2009).

b) Les cellules à cristaux

D'une taille comparable à celle des plasmatoctes (environ 10µm de diamètre), les cellules à cristaux représentent seulement 5% des cellules immunitaires/sanguines présentes dans l'hémolymph au stade larvaire (**Figure 4-B** ; Lanot et al., 2001). Leur fonction est apparentée à celle des mégakaryocytes, qui permettent la formation des plaquettes chez les mammifères. Les cellules à cristaux permettent la mélanisation et sont requises dans le processus de cicatrisation (cf introduction III-B). Elles doivent leur nom à la présence dans leur cytoplasme de cristaux caractéristiques résultants de l'agrégation de Prophénoloxidas (PPOs), enzymes essentielles à la synthèse de la mélanine.

c) Les lamellocytes

Les lamellocytes sont dédiés à l'encapsulation, qui permet la neutralisation d'objets trop gros pour être phagocytés (**Figure 4-C** ; cf introduction III-B). Les lamellocytes sont de grandes cellules plates et adhérentes, d'un diamètre d'environ 40 µm. Contrairement aux plasmatoctes et cellules à cristaux, qui sont produits constitutivement au cours du développement, les lamellocytes ne sont pas produits au stade embryonnaire. Au stade larvaire, ils ne sont que très peu ou pas produits dans des conditions physiologiques normales (en absence de stress immun) et ne se différencient massivement que dans certains contextes mutants ou dans des conditions de stress immunitaire. La différenciation de lamellocytes est en particulier

observée en réponse à l'infection par des guêpes parasitoïdes, telles que la guêpe *Leptopilina boulardi* (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007).

La présence massive de lamellocytes se traduit par la formation de « tumeurs » mélanisées, désignées sous le terme de masses mélanotiques. Ces masses mélanotiques sont observées dans différents mutants, dont le mutant *hop^{TumI}*, qui conduit à une activation constitutive de la kinase Hopscotch (Hop), nécessaire à la transduction de la signalisation JAK/STAT (Luo et al., 1995; Sorrentino et al., 2004) ; et le mutant *l(3)mbn1*, gène suppresseur de tumeur (Konrad et al., 1994). De façon intéressante, la présence de masses mélanotiques est également observée dans le mutant *tol10B*, où la voie Toll/NFκB est constitutivement activée, indépendamment de la présence de son ligand (Kubota et al., 1993).

Les deux compartiments hématopoïétiques larvaires, c'est-à-dire la GL et les compartiments sessiles, sont tous deux sources de lamellocytes. Récemment il a été montré que les plasmatocytes eux-mêmes peuvent sous certaines conditions de stress immunitaire se transdifférencier en lamellocytes (Honti et al., 2009; Stofanko et al., 2010). En effet, il a été observé qu'après parasitisme, certains plasmatocytes perdent progressivement l'expression de marqueurs spécifiques de ce lignage, comme la Peroxidasine ou les récepteurs dédiés à la phagocytose Eater ou NimC1, et acquièrent l'expression de marqueurs spécifiques des lamellocytes, comme Atila-L1 ou Misshapen (Msn) (Honti et al., 2009; Kurucz et al., 2007). Dans notre équipe, il a été observé lors d'une tentative d'imagerie en temps réel de la GL un changement de forme de cellules à cristaux vers une morphologie proche de celle des lamellocytes, ainsi qu'une perte de l'expression par ces cellules du marqueur *black cell-GFP (bc-GFP)*, spécifique à ce lignage (Ismaël Morin-Poulard : données non publiées de l'équipe). Cette différenciation en lamellocytes pourrait être due la puissance des lasers utilisés, qui a pu conduire à une production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Bien que préliminaire, cette observation indique qu'une transdifférenciation des cellules à cristaux vers le lignage lamellocytes pourrait également être possible. L'ensemble de ces données indique qu'il existe une grande plasticité des lignages sanguins chez la drosophile.

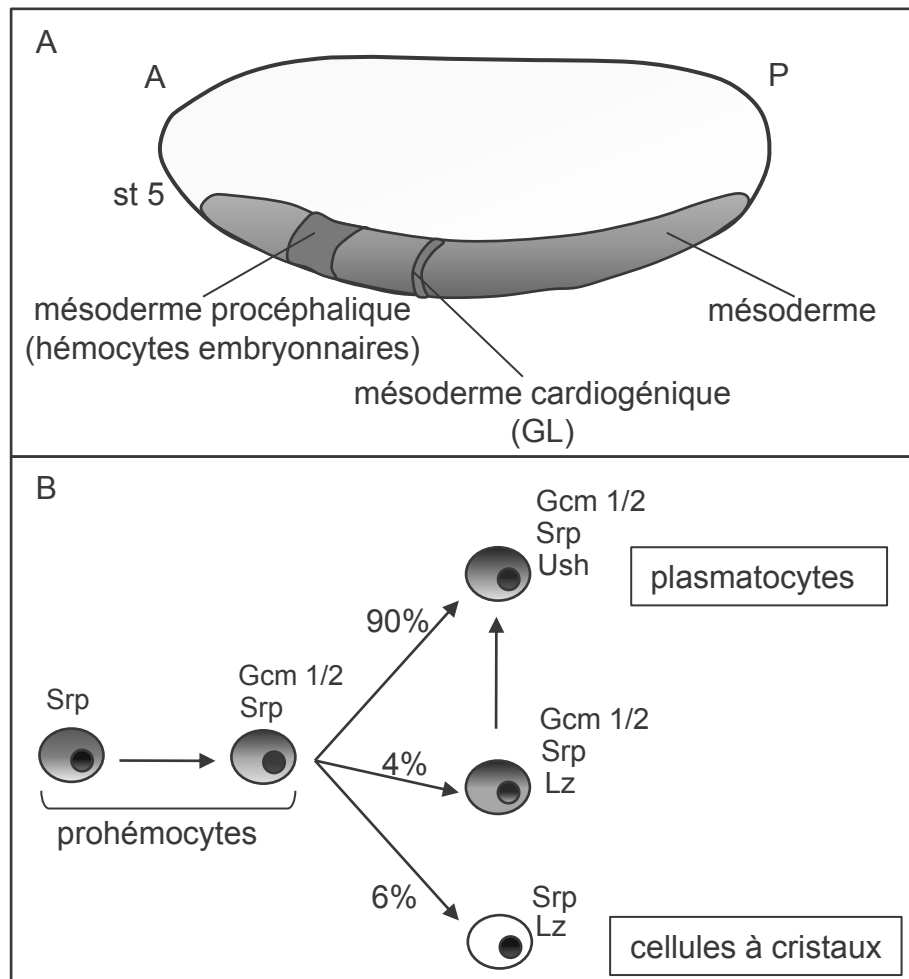


Figure 5 : L'hématopoïèse embryonnaire de la drosophile

- A. Au stade embryonnaire 5 (2H30 après la ponte), deux régions au sein du mésoderme (marron) correspondent aux précurseurs des tissus hématopoïétiques : le mésoderme procéphalique (violet), qui va générer des plasmatocytes et des cellules à cristaux lors de l'hématopoïèse embryonnaire, et le mésoderme cardiogénique (bleu), à partir duquel va se former la GL.
- B. Les progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires, ou prohémocytes, expriment le facteur de transcription *Serpent* (Srp) dès le stade embryonnaire 5, puis initient l'expression de *glial cell missing 1* et 2 (*gcm1/2*) à partir du stade 7 (3H après la ponte). Dans 94% des prohémocytes, l'expression de *gcm1/2* est maintenue, et les cellules se différencient en plasmatocytes. Parmi les prohémocytes, une faible proportion (4%) va exprimer transitoirement le gène *lozenge* (*lz*). Les plasmatocytes différenciés vont ensuite exprimer *u-shaped* (*ush*). Les hémocytes en formation qui ne maintiennent pas l'expression de *gcm1/2* vont exprimer *lz* et se différencier en cellules à cristaux.

(adapté de Crozatier and Meister; 2007).

2) L'hématopoïèse embryonnaire

La première vague d'hématopoïèse (hématopoïèse primitive) débute dès le stade embryonnaire 5 et est qualifiée d'hématopoïèse embryonnaire (**Figure 5**). Elle a lieu à partir du mésoderme procéphalique de l'embryon et permet la formation d'environ 700 plasmacytes et d'une soixantaine de cellules à cristaux (Holz et al., 2003). Alors que les plasmacytes vont progressivement migrer et coloniser tout le corps de l'embryon au cours de son développement, les cellules à cristaux restent groupées en deux groupes bilatéraux présents dans la partie antérieure de l'embryon.

Les cascades moléculaires permettant la différenciation des plasmacytes et cellules à cristaux ont été établies et nécessitent plusieurs facteurs de transcription (**Figure 5**). De façon intéressante, comme chez les mammifères des facteurs de type GATA, FOG et RUNX sont impliqués dans le contrôle génétique de l'hématopoïèse chez la drosophile. Le facteur de type GATA appelé Serpent (Srp) est exprimé entre autres dans le mésoderme procéphalique dès le stade 5 et nécessaire à sa spécification en tissu hématopoïétique (Waltzer et al., 2003). L'expression de Srp est maintenue dans toutes les cellules à destin hématopoïétique. Les facteurs de transcription Glial cells missing (Gcm) 1 et 2, Lozenge (Lz) et U-shaped (Ush) sont exprimés plus tardivement au cours du développement embryonnaire et permettent de définir le destin plasmacyte ou cellule à cristaux des cellules immunitaires. En effet à partir du stade embryonnaire 7 (3H après la ponte) l'expression de Lz, facteur de transcription de type RUNX, dans les cellules les plus antérieures du territoire hématopoïétique va permettre leur spécification en cellules à cristaux (Bataillé et al., 2005; Lebestky et al., 2000) tandis que l'expression de Gcm 1 et 2 dans le reste du territoire est nécessaire à l'acquisition d'un destin plasmacyte. Gcm 1 et 2 sont tout d'abord exprimés dans l'intégralité du territoire hématopoïétique puis leur expression est restreinte aux cellules les plus postérieures. Ush, facteur de type FOG qui se lie à Srp, est quant à lui exprimé uniquement dans les plasmacytes en devenir, où il inhibe l'expression de Lz et empêche ainsi la différenciation de ces cellules en cellules à cristaux (Fossett et al., 2003; Waltzer et al., 2002; Waltzer et al., 2003).

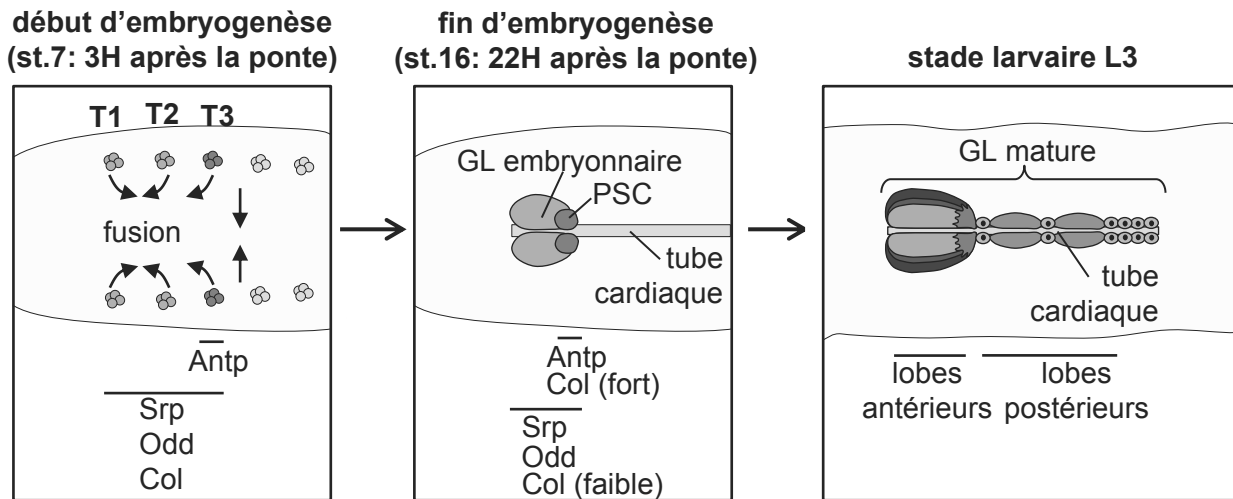


Figure 6 : L'ontogenèse de la Glande Lymphatique

Les facteurs de transcription *Srp*, *Odd* et *Col* sont exprimés au stade embryonnaire 7 dans les segments thoraciques T1 à T3 et sont requis à la formation de la GL. *Antp* est exprimé uniquement dans le groupe de cellules du segment T3; son expression est maintenue dans ces cellules et est nécessaire à la formation du PSC. Au stade embryonnaire 16, l'expression de *Col* diminue dans la GL et reste forte dans le PSC. *Col* est requis pour la spécification du PSC au stade embryonnaire. Au stade larvaire L3, la GL est composée de lobes antérieurs formés lors de l'embryogenèse et de lobes postérieurs qui se développent au cours des stades larvaires.

(adapté de Crozatier et al., 2004)

3) L'hématopoïèse larvaire

Au stade larvaire, deux compartiments distincts contribuent à l'hématopoïèse: la Glande Lymphatique (GL), site majeur de production des hémocytes, et les compartiments sessiles, récemment identifiés.

a) L'ontogenèse de la Glande Lymphatique (GL)

La GL, organe dédié à l'hématopoïèse au stade larvaire, est spécifiée au stade embryonnaire à partir de trois groupes de cellules mésodermiques présents de chaque côté des segments thoraciques T1, T2 et T3 (**Figure 6** ; Crozatier et al., 2004; Mandal et al., 2004). Cette région du mésoderme latéral est appelée mésoderme cardiogénique car y est spécifié, en plus de la GL, le tube cardiaque, correspondant au cœur et au système vasculaire de la drosophile (Mandal et al., 2004). Au cours du développement embryonnaire, les trois groupes de cellules précurseurs de la GL vont fusionner pour donner les deux lobes primaires de la GL, le long du tube cardiaque.

Plusieurs facteurs de transcription sont nécessaires à la spécification de la GL. Les facteurs de transcription Srp et Oddskipped (Odd) sont exprimés au stade embryonnaire 5 dans les segments T1 à T3 et requis à la spécification de l'organe. Leur expression est ensuite maintenue dans la GL tout au long du développement (Jung et al., 2005; Mandal et al., 2007; Martinez-Agosto et al., 2007). Collier (Col), orthologue du facteur de transcription vertébré Early B-Cell Factor (EBF1), ainsi que le facteur homéotique Antennapedia (Antp) sont requis à la formation du PSC, centre de signalisation localisé du côté postérieur de la GL (cf introduction II-B-1 ; Crozatier et al., 2004; Mandal et al., 2004). Antp n'est exprimé que dans le segment T3, qui va générer le PSC, tandis que Col est exprimé au stade embryonnaire dans toute la GL en formation, puis son expression est progressivement restreinte dans la GL pour n'être maintenue à un fort niveau que dans le PSC (Crozatier et al., 2004). Col et Antp sont tous deux requis à la spécification du PSC, Col agissant en aval d'Antp.

A la fin du premier stade larvaire/au début du deuxième (L1/L2) débute la formation de plusieurs paires de lobes plus petits appelés lobes secondaires ou postérieurs, localisés postérieurement aux lobes primaires le long du tube cardiaque (Hartenstein, 2006). Dans les lobes primaires, des cellules immunitaires différenciées commencent à être observées au début du troisième stade larvaire (eL3). Au cours

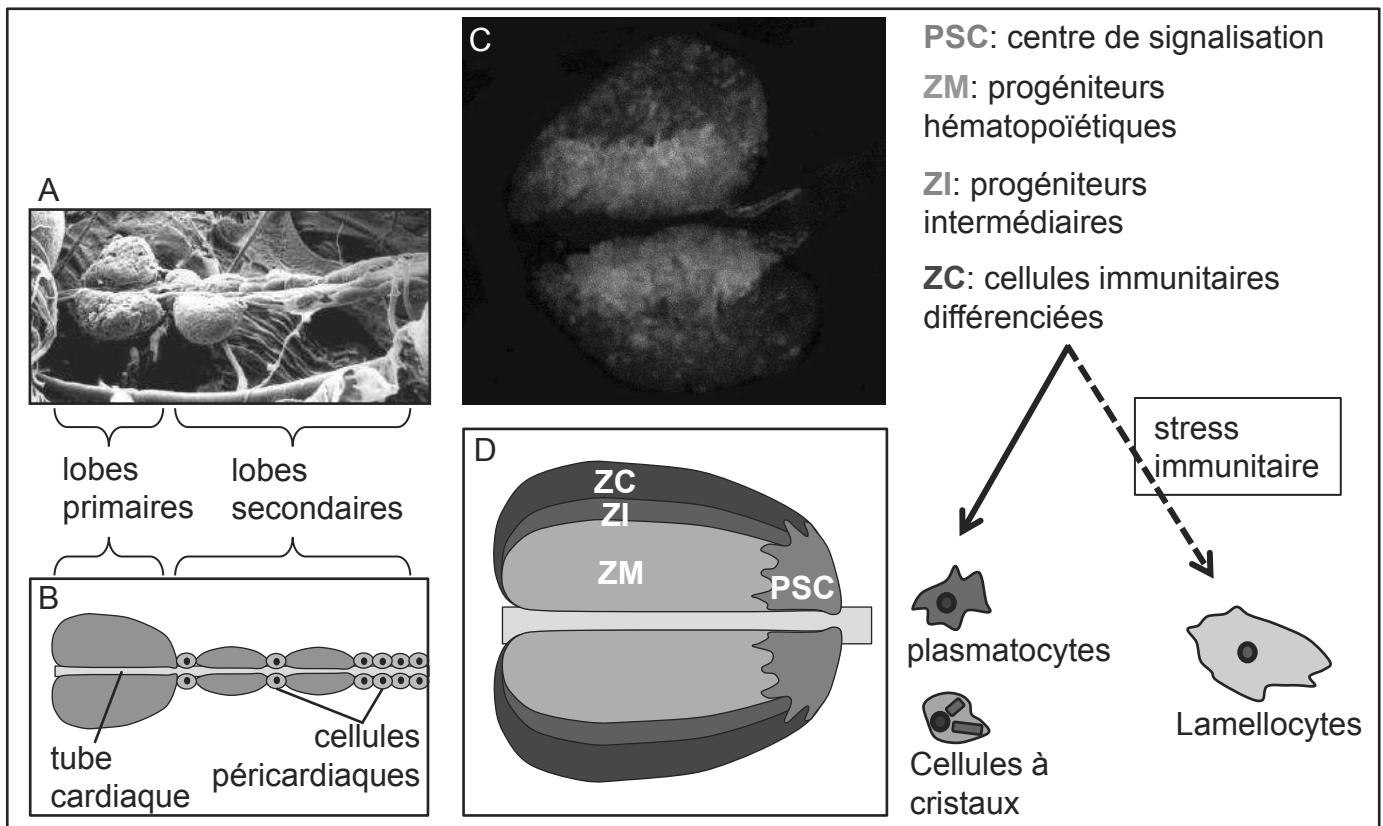


Figure 7 : La Glande Lymphatique larvaire

A-B. La GL larvaire, localisée le long du tube cardiaque, est composée d'une paire de lobes primaires (côté antérieur) et de plusieurs paires de lobes secondaires (côté postérieur)

C-D. Chaque lobe primaire est divisé en plusieurs zones distinctes :

- La Zone Médullaire (vert), contenant les progéniteurs hématopoïétiques
- La Zone Intermédiaire (bleu-vert), contenant des progéniteurs plus avancés dans leur processus de différenciation.
- La Zone Corticale (bleu), composée d'hémocytes différenciés provenant de la ZM. Les progéniteurs hématopoïétiques se différencient en plasmacytes et cellules à cristaux en l'absence de stress immunitaire, ou en lamellocytes suite à un parasitisme par des guêpes.
- Le PSC (rouge), centre de signalisation localisé en postérieur de chaque lobe primaire, dont la fonction est de réguler l'homéostasie de la GL.

(d'après Lanot et al., 2001 ; Jung et al., 2005 ; Krzemien et al., 2010)

du développement, les cellules des lobes primaires vont proliférer, jusqu'à atteindre environ 3000 cellules chacun en milieu de troisième stade larvaire (mL3). Au stade mL3, les hémocytes différenciés représentent environ la moitié de la taille des lobes primaires, tandis que les lobes secondaires ne contiennent que des cellules exprimant de façon hétérogène certains marqueurs de progéniteurs hématopoïétiques et ne présentent pas de structure apparente.

b) La GL au stade mL3

A ce stade les lobes primaires ont une organisation stéréotypée, divisée en plusieurs zones distinctes (**Figure 7** ; Jung et al., 2005) :

- La **Zone Médullaire (ZM)**, région la plus médiale de la GL, contient les progéniteurs hématopoïétiques. Cette zone est organisée en pseudo-épithélium et exprime différents marqueurs, dont *tep4*, *Domeless* (*Dome*) et *DE-cadhérine*.
- Localisée au cortex de la GL, la **Zone Corticale (ZC)** est composée des cellules immunitaires matures provenant de la différenciation des progéniteurs présents dans la ZM. En contexte physiologique « normal », c'est-à-dire en absence de stress immunitaire, la ZC est composée de plasmacytes et de cellules à cristaux. Le troisième type de cellules immunitaires, les lamellocytes, est cryptique et n'est différencié dans la GL qu'après un challenge immunitaire.
- La différenciation des prohémoctes en hémocytes matures est un processus progressif. L'existence d'une population de progéniteurs intermédiaires n'exprimant plus les marqueurs des progéniteurs mais pas encore les marqueurs de différenciation terminale des cellules de la ZC a été proposée (Jung et al., 2005; Krzemien et al., 2010; Tokusumi et al., 2011). Ces progéniteurs formeraient une **Zone Intermédiaire (ZI)**, située entre la ZM et la ZC.
- Localisé du côté postérieur des lobes primaires, le **Centre de Signalisation Postérieur (PSC)** représente environ 1% des cellules de la GL et exprime différents marqueurs, comme *Hedgehog* (*Hh*), *Antp*, *Col*, *Serrate* (*Ser*). Il a été proposé que le PSC joue un rôle de centre signalisateur, en contrôlant l'homéostasie de la GL (Benmimoun et al., 2012; Dragojlovic-Munther and

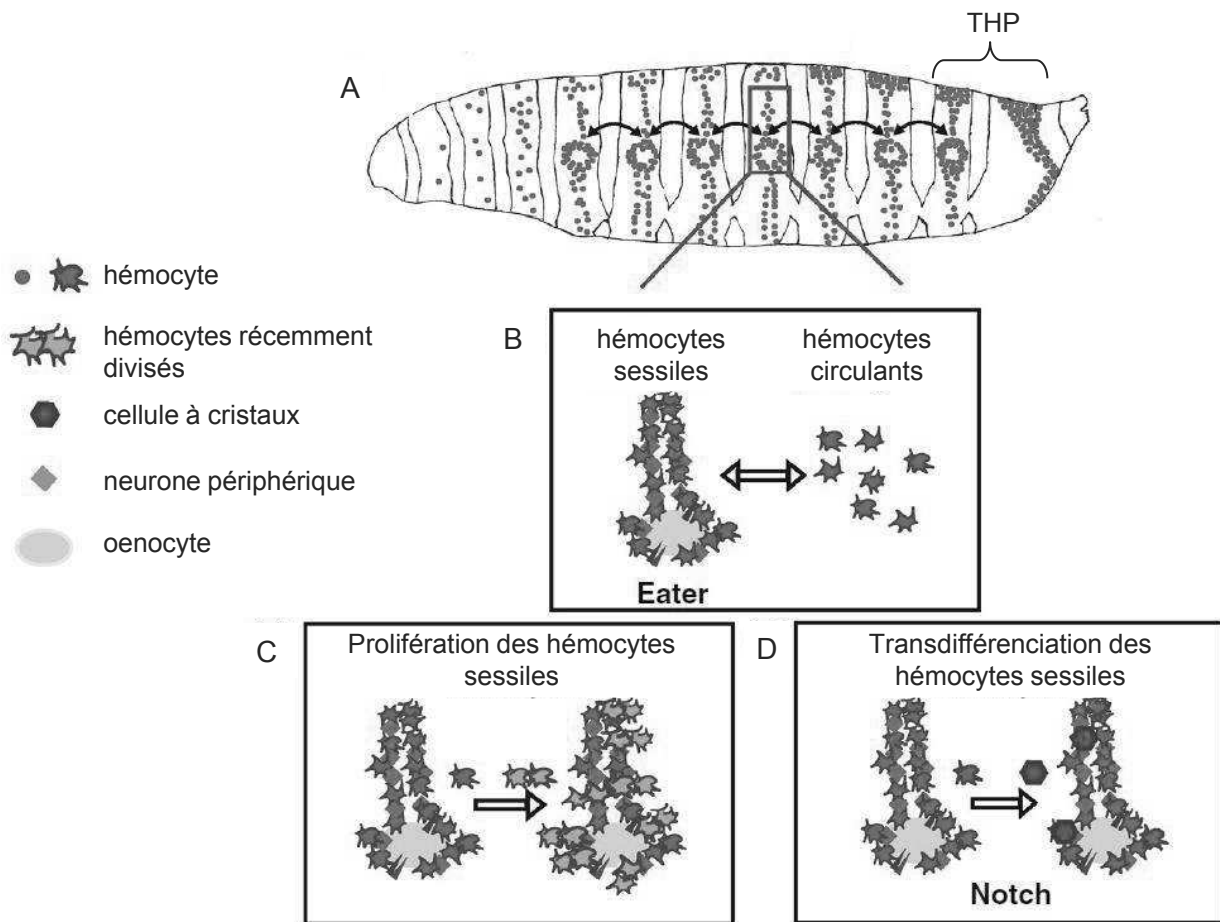


Figure 8 : Les compartiments hématopoïétiques sessiles de la larve de drosophile

- Représentation schématique de la distribution des hémocytes en circulation au troisième stade larvaire. Des hémocytes sont agglutinés sous la cuticule suivant la segmentation de la larve, formant des groupes appelés compartiments sessiles. Des amas d'hémocytes plus larges sont présents dans les derniers segments abdominaux et appelés Tissu Hématopoïétique Postérieur (THP). Les hémocytes peuvent passer de ces compartiments à la circulation lymphatique et inversement (représenté par les doubles flèches).
 - Les compartiments sessiles se forment autour des oenocytes, au contact de neurones du Système Nerveux Périphérique impliqués dans l'attraction des hémocytes. Le regroupement des hémocytes au niveau des compartiments sessiles nécessite l'expression de la protéine Eater dans les plasmatocytes. Des échanges entre la circulation lymphatique et les compartiments sessiles peuvent avoir lieu.
 - Les plasmatocytes présents au niveau des compartiments sessiles peuvent proliférer.
 - De la transdifférenciation de plasmatocytes en cellules à cristaux a été décrite au niveau des compartiments sessiles. Ce processus est dépendant de la signalisation Notch (N).
- (adapté de Ratheesh et al., 2015)

Martinez-Agosto, 2012; Krzemien et al., 2010; Krzemień et al., 2007; Lam et al., 2014; Mandal et al., 2007; Mondal et al., 2011; Mondal et al., 2014). Les cellules du PSC possèdent des extensions cytoplasmiques appelées filopodes. Récemment, Fuwa et al. suggèrent que ces filopodes sont nécessaires à la communication entre PSC et hémocytes (Fuwa et al., 2015). En effet, ils observent qu'en absence d'antigène T, l'extension de filopodes à partir des cellules du PSC est abolie, entraînant une différenciation accrue des hémocytes dans la GL. L'expression de l'antigène T serait nécessaire dans les plasmacytes présents dans la ZC, afin de générer un environnement extracellulaire capable de supporter l'extension de filopodes.

Dans un contexte « normal », c'est-à-dire en absence de stress immunitaire, les cellules contenues dans la GL (progéniteurs et cellules différenciées) vont être relâchées dans la circulation lymphatique au moment de la métamorphose, après dispersion de la GL (Hartenstein, 2006). Néanmoins la dispersion de la GL peut aussi avoir lieu de façon prématurée, en particulier en réponse au parasitisme par des guêpes. Dans ces conditions, les progéniteurs de la ZM ainsi que ceux présents dans les lobes secondaires se différencient massivement en lamellocytes, puis environ un jour après parasitisme (à 25°C) les lobes primaires se désagrègent, libérant les lamellocytes dans la circulation lymphatique, où ils sont requis à la neutralisation du pathogène (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007).

c) Les compartiments sessiles larvaires et adultes

Dans les larves au stade L3 et dans les adultes, en plus des cellules immunitaires en circulation dans l'hémolymphe, des hémocytes sont aggrégés en amas sous l'épiderme, formant des groupes de cellules désignés sous le nom de compartiments sessiles (Kurucz et al., 2007; Lanot et al., 2001; Makhijani et al., 2011). Chez la larve les hémocytes sessiles forment des bandes le long de la cuticule, avec deux clusters plus larges localisés dans les deux derniers segments abdominaux et appelés « Tissu Hématopoïétique Postérieur » (THP) (**Figure 8** ; Kurucz et al., 2007). Il a été récemment rapporté que ces compartiments sont des sites hématopoïétiques fonctionnels (Leitão and Sucena, 2015). En effet, partant du constat que le nombre de cellules à cristaux, post-mitotiques, augmente au cours du développement larvaire

avant même la dispersion de la GL, les auteurs ont démontré que ces cellules résultent d'une différenciation *de novo* ayant lieu dans les compartiments sessiles. Ils ont de plus observé que certaines des cellules à cristaux ainsi formées résultent de la transdifférenciation de plasmacytes matures, qui perdent l'expression du facteur de différenciation Nimrod C1 ainsi que leur activité phagocytaire, pour acquérir l'expression du marqueur Lz, spécifique des cellules à cristaux (Leitão and Sucena, 2015). De plus, il a été montré que la protéine Eater, récepteur transmembranaire de la famille Nimrod, est nécessaire dans les plasmacytes pour permettre leur recrutement ainsi que celui des cellules à cristaux au niveau des compartiments sessiles (Bretscher et al., 2015). Le Système Nerveux Périphérique (SNP) est également impliqué dans la formation des compartiments sessiles : en effet en absence de certains neurones du SNP, dans le mutant *atonal*, on observe un déficit en hémocytes sessiles, tandis qu'un nombre plus élevé de neurones, généré par l'expression ectopique du gène pro-neural *scute*, attire les hémocytes en circulation vers ces neurones ectopiques (Makhijani et al., 2011). En plus des cellules à cristaux, les compartiments sessiles sont responsables de la production de lamellocytes après parasitisme (Márkus et al., 2009).

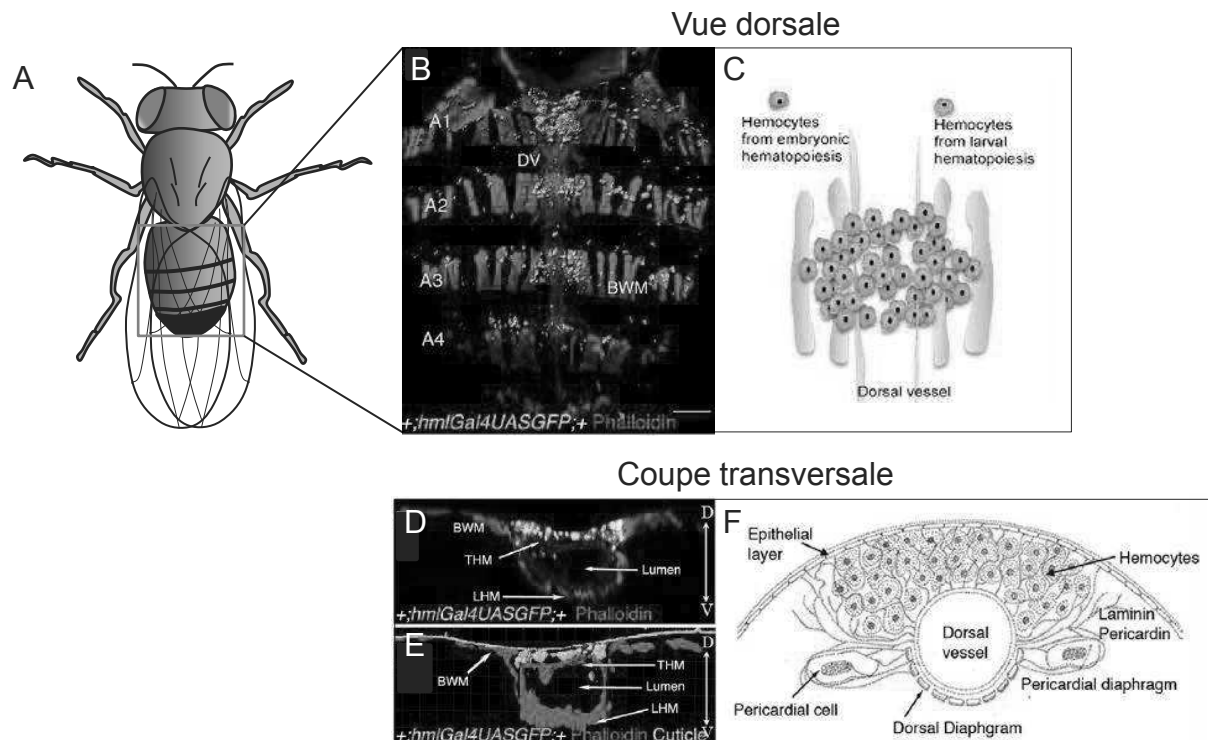


Figure 9 : Les « nœuds hématopoïétiques » de la drosophile adulte

Des sites hématopoïétiques appelés nœuds hématopoïétiques ont été décrits dans l'abdomen de la drosophile adulte (A). Ces sites sont localisés le long du tube cardiaque (DV), dans les segments abdominaux A1 à A4 (B). La présence d'hémocytes est détectée grâce à l'expression de la GFP sous le contrôle du pilote *hml-gal4* (vert), et le tube cardiaque ainsi que la musculature sont visualisés grâce à un marquage phalloïdine (rouge) (B, D, E). Les hémocytes présents dans les nœuds hématopoïétiques proviennent des vagues hématopoïétiques embryonnaire et larvaire (C). En coupe transversale, on observe que ces hémocytes sont localisés entre le cœur et la cuticule de la drosophile (D,E). Une représentation schématique d'un nœud hématopoïétique est donnée en F. (BWM : body wall muscle; THM : transverse heart muscle; LHM : longitudinal heart muscle) (d'après Ghosh et al., 2015)

4) Les nœuds hématopoïétiques de la drosophile adulte

Il a longtemps été considéré qu'il n'existe pas d'hématopoïèse chez la drosophile adulte, car le nombre d'hémocytes présents chez l'adulte décroît avec le temps. Il est admis que les cellules immunitaires présentes chez l'adulte proviennent uniquement des événements d'hématopoïèse embryonnaires et larvaires (Holz et al., 2003; Honti et al., 2014). Néanmoins, S. Ghosh et al. proposent que de l'hématopoïèse a lieu chez l'adulte (Ghosh et al., 2015). Les auteurs ont identifiés chez l'adulte quatre clusters d'hémocytes localisés du côté dorsal des segments abdominaux A1 à A4 qu'ils appellent « nœuds hématopoïétiques » et dans lesquels sont présents des plasmacytes, des cellules à cristaux et des progéniteurs indifférenciés (**Figure 9**). Par des expériences de lignage, les auteurs montrent que les cellules de ces nœuds proviennent à la fois de l'hématopoïèse embryonnaire et des lobes postérieurs de la GL larvaire. De plus, ils ont observé une production *de novo* de plasmacytes (exprimant le marqueur Hemolectine) et de cellules à cristaux (exprimant Hindsight ou *lz>GFP*) à partir de ces clusters, et proposent donc que ce sont de réels sites hématopoïétiques. Ces résultats posent la question de la définition précise du terme hématopoïèse. Des événements de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques ont clairement lieu dans ces nœuds hématopoïétiques ; néanmoins la présence et la division de progéniteurs n'est pas démontrée. Cette question reste d'ailleurs très difficile à aborder, car on ne dispose pas de marqueurs permettant d'identifier et de suivre les prohématocytes chez l'adulte.

Chez les vertébrés comme chez les mammifères, l'hématopoïèse est donc un processus complexe, qui se déroule par étapes successives au cours du développement. Ce processus doit être finement contrôlé, toute dérégulation pouvant avoir de graves conséquences, comme par exemple le développement pathologies hématopoïétiques telles que les leucémies.

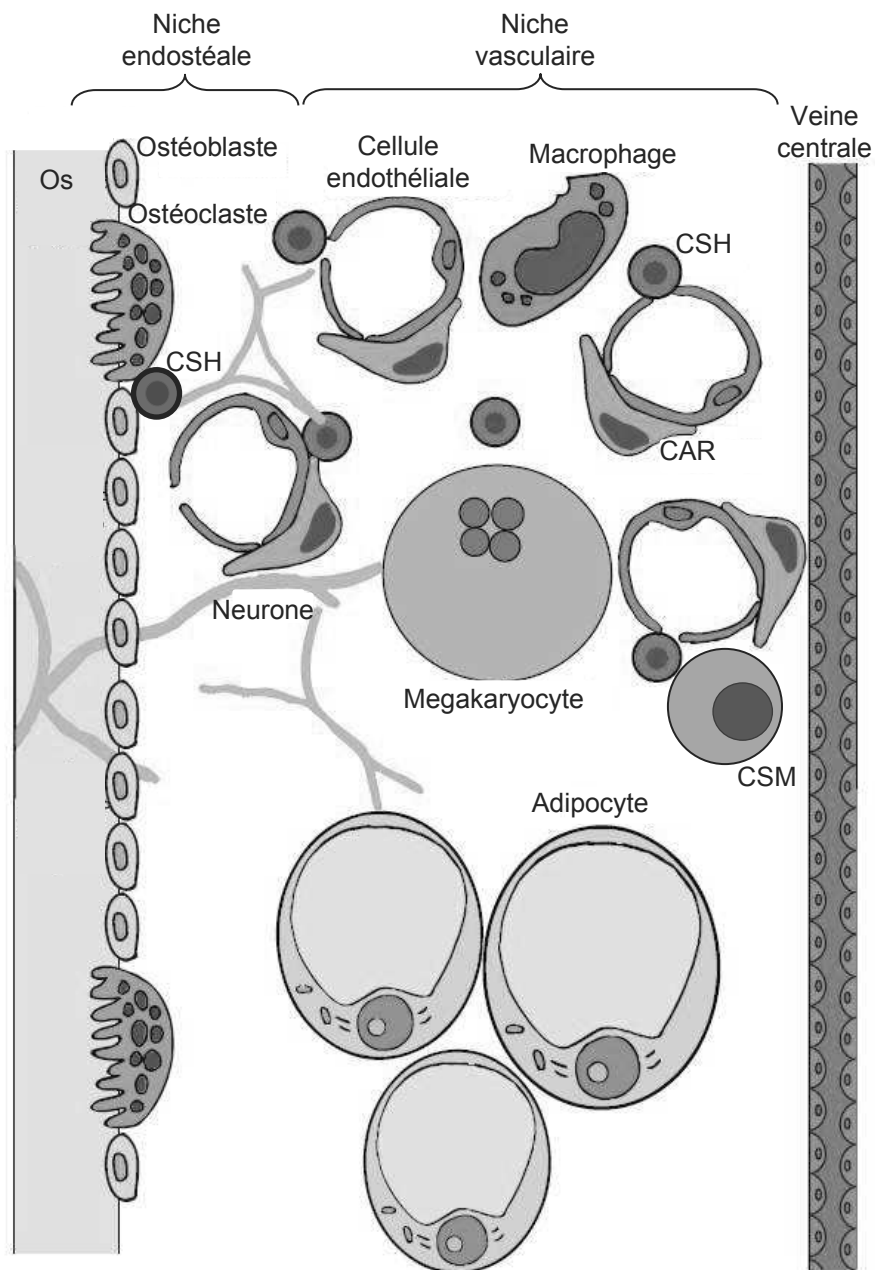


Figure 10 : La niche hématopoïétique des mammifères adultes

Le microenvironnement présent dans la moëlle osseuse, appelé « niche hématopoïétique », régule la prolifération, la différenciation et l'auto-renouvellement des CSHs. Deux niches peuvent être distinguées : la niche endostéale, au contact direct de l'os, et la niche vasculaire, associée aux artérioles assurant la vascularisation de la moëlle osseuse. De nombreux types cellulaires interviennent dans la régulation des CSHs : ostéoblastes et ostéoclastes, cellules endothéliales, macrophages, Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSMs), Cellules Réticulaires (CARs), neurones du Système Nerveux Périphérique. Au cours du vieillissement, la moëlle osseuse contient de plus en plus d'adipocytes, et une réduction des capacités hématopoïétiques est observée.

(adapté de Al-Drees et al., 2015)

II. La régulation de l'hématopoïèse

A) Chez les mammifères adultes

1) En absence d'infection

Les capacités d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation des CSHs comme des autres types de cellules souches sont régulées par leur microenvironnement, appelé niche. Ce concept de niche a d'abord été proposé en 1978 par Ray Schofield, qui a observé que la rate était incapable de soutenir les CSHs de la même façon que la moëlle osseuse, et en a déduit que le microenvironnement présent dans la moëlle osseuse devait contenir divers facteurs essentiels à leur contrôle (Schofield, 1978). Au cours du développement, différentes niches contrôlent les CSHs à toutes les étapes de l'ontogenèse du système hématopoïétique (dans le foie fœtal, l'AGM... cf introduction I-A). Chez les mammifères adultes, il a été proposé que la niche hématopoïétique qui contrôle les CSHs dans la moëlle osseuse se divise en deux composantes anatomiquement distinctes : une niche dite « endostéale », proche de la surface de l'os, et une niche dite « vasculaire », proche des artérioles qui permettent la vascularisation de la moëlle osseuse (**Figure 10**, Al-Drees et al., 2015; Nombela-Arrieta et al., 2013).

a) La niche endostéale

La niche endostéale est en contact avec l'os en formation (appelé endosteum). Elle possède des propriétés physiologiques uniques, en particulier une grande concentration en ions calcium provenant de la surface de l'os, et une faible teneur en nutriments et en oxygène (Lam and Adams, 2010; Nombela-Arrieta et al., 2013). De par ces propriétés, il a été proposé que la niche endostéale permet le maintien des CSHs en dormance et ayant un temps de renouvellement très long, appelées Long Term-CSHs (LT-CSHs), tandis que la niche vasculaire pourrait contrôler les CSHs ayant une prolifération plus active et prêtes à se différencier, appelées Short Term-CSHs : (ST-CSHs) (Nilsson et al., 2001). On sait aujourd'hui que la situation est plus complexe, et que des LT-CSHs sont également sous le contrôle de la niche dite vasculaire (Kiel et al., 2005; Kunisaki and Frenette, 2014). Les composants principaux de la niche endostéale sont les ostéoblastes, cellules qui synthétisent l'os

et auxquelles adhèrent les CSHs. En effet, une ablation des ostéoblastes au cours de développement par un système inductible conduit à une perte massive des CSHs (Visnjic et al., 2004), tandis qu'au contraire une augmentation du nombre d'ostéoblastes, obtenue par délétion conditionnelle du récepteur BMPR1a dans ces cellules, conduit à une augmentation du nombre de CSHs (Zhang et al., 2003). Ces données révèlent le rôle clé joué par les ostéoblastes dans le maintien des CSHs. Les ostéoclastes, macrophages responsables de la dégradation de l'os, sont également impliqués dans le maintien des CSHs dans la niche endostéale. Leur inactivation pharmacologique conduit en effet à une réduction du nombre de CSHs (Lymperi et al., 2011).

Les signaux moléculaires impliqués dans le contrôle des CSHs sont nombreux et de différentes natures : cytokines, facteurs de croissance, hormones, molécules d'adhésion... Certains de ces signaux ont été clairement identifiés. C'est par exemple le cas de la chimiokine CXCL12, également appelée Stroma-Derived Factor 1 (SDF1). CXCL12 est produite par les ostéoblastes et active son récepteur CXCR4 présent à la surface des CSHs. Cette activation est nécessaire à la localisation des CSHs dans la moëlle osseuse (Sugiyama et al., 2006). L'ancrage des CSHs à la niche endostéale est dépendant de différentes molécules d'adhésion, dont la protéine Vascular Cell Adhésion Molécule 1 (VCAM1), exprimée entre autres par les ostéoblastes. VCAM1 interagit avec l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ des CSHs pour permettre leur maintien dans la moëlle osseuse (Jiang et al., 2009; Lewandowski et al., 2010). D'autres interactions ligand/récepteur entre CSHs et ostéoblastes interviennent dans l'ancrage ou le contrôle des CSHs. C'est le cas pour la N-cadhérine, exprimée par les CSHs, qui interagit avec la β -caténine, exprimée par les ostéoblastes. L'inhibition de la N-cadhérine dans les CSHs entraîne une diminution de leur nombre (Hosokawa et al., 2010; Zhang et al., 2003). La liaison directe entre l'Angiopoïétine (Ang-1), exprimée par les ostéoblastes, et son récepteur exprimé par les CSHs, Tie2, intervient également dans l'ancrage des CSHs (Arai et al., 2004). Enfin, les voies de signalisation Wnt (Wnt), Notch (N) et SonicHedgehog (SHh) ont été montrées comme essentielles dans le contrôle des CSHs par la niche hématopoïétique. Dans les trois cas, leur rôle apparaît complexe et parfois même controversé, révélant la grande complexité des régulations mises en jeu au sein de la niche (pour revue : (Lo Celso and Scadden, 2011)). Pour la voie Wnt par exemple, une première étude a

montré que son inhibition dans les CSHs n'affecte en rien leur auto-renouvellement et leur capacité à générer l'ensemble du lignage hématopoïétique, suggérant que la voie Wnt n'est pas nécessaire de façon cellulaire-autonome dans le contrôle des CSHs (Cobas et al., 2004). D'autres études proposent qu'elle est par contre requise dans la niche hématopoïétique pour permettre le contrôle des CSHs (Fleming et al., 2008; Renström et al., 2009). En effet, la surexpression spécifiquement dans les ostéoblastes d'un inhibiteur de la voie Wnt, Dickkopf Homologue 1 (DKK1), entraîne un défaut d'auto-renouvellement des CSHs (Fleming et al., 2008). Renstrom et al. observent également que le nombre de LT-CSHs est augmenté dans des souris déficientes pour un autre régulateur négatif de la voie Wnt, Secreted Frizzled-Related Protein 1 (SFRP1), suggérant que l'activité de la voie Wnt est nécessaire dans la niche hématopoïétique pour contrôler les CSHs (Renström et al., 2009). Le rôle des voies de signalisation N et SHh dans la niche hématopoïétique est également complexe. Dans certaines études, la manipulation génétique de ces voies conduit à une modification du nombre de CSHs dans la moëlle osseuse, suggérant leur rôle dans la régulation des CSHs, tandis que d'autres études les montrent dispensables (Lo Celso and Scadden, 2011).

b) La niche vasculaire

Par des techniques d'imagerie, des études récentes ont établi que la majorité des CSHs quiescentes est localisée au contact des artérioles qui assurent la vascularisation de la moëlle osseuse (Kunisaki et al., 2013; Kunisaki and Frenette, 2014). Les cellules endothéliales qui composent ces vaisseaux sanguins sont directement impliquées dans le contrôle des CSHs. En effet, la délétion de la molécule d'adhésion E-sélectine, exprimée spécifiquement dans les cellules endothéliales, conduit à une forte diminution de la prolifération des CSHs (Winkler et al., 2012), indiquant un rôle direct des cellules endothéliales dans le contrôle des CSHs. De plus, la délétion du ligand KitL dans les cellules endothéliales entraîne une perte de CSHs. Ce ligand se lie au récepteur c-kit présent à la surface des CSHs (Ding et al., 2012). En plus de ces facteurs spécifiques, les cellules endothéliales expriment de nombreuses autres molécules jouant un rôle dans le contrôle des

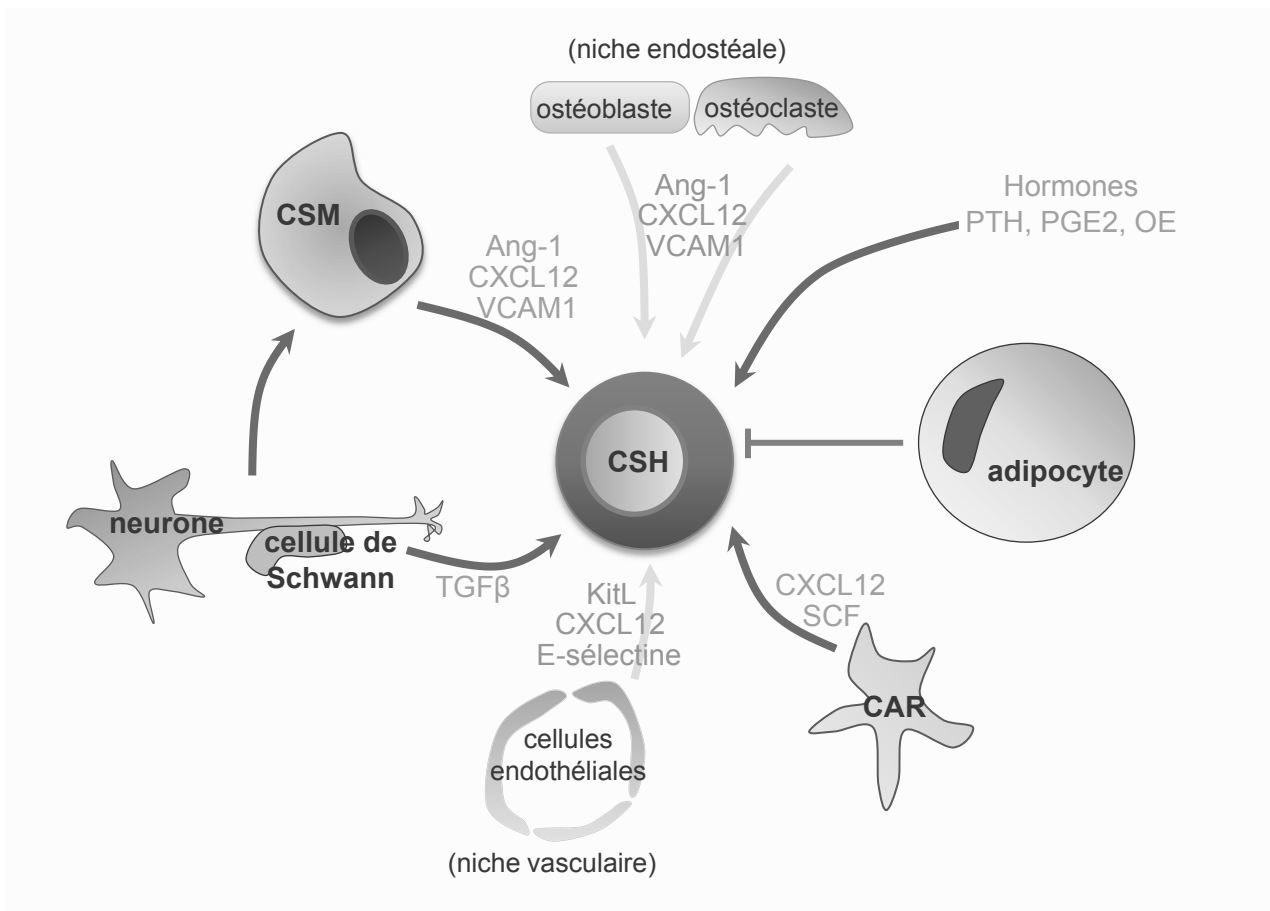


Figure 11 : Les autres acteurs du contrôle de l'hématopoïèse

Outre les composants de la niche endostéale (ostéoblastes et ostéoclastes) et de la niche vasculaire (cellules endothéliales), de nombreux autres types cellulaires appelés cellules stromales présents dans la moëlle osseuse interviennent dans la régulation des CSHs : 1) les Cellules Réticulaires (CARs), via la production de CXCL12 et de SCF, 2) le système nerveux périphérique, dont certains neurones contrôlent la production de molécules de régulation par les autres cellules de la niche, tandis que les cellules gliales de Schwann produisent du TGFβ, 3) les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSMs), qui expriment CXCL12, l'Angiopoïétine (Ang-1) et la molécule d'adhésion VCAM1. Enfin, des hormones, en particulier les hormones parathyroïdiennes (PTH), la Prostaglandine 2 (PGE2) et les Oestrogènes (OE), favorisent le maintien des CSHs dans la moëlle osseuse, au contraire des adipocytes, qui favorisent leur mobilisation hors de la moëlle osseuse.

(adapté de Anthony and Link, 2014)

CSHs, comme CXCL12, SCF, VCAM1 et Ang-1. Les cellules endothéliales sont capables *in vitro* de permettre le maintien des CSHs (Chute et al., 2006).

c) Les autres acteurs du contrôle de l'hématopoïèse

Outre les composants des niches endostéale et vasculaire, de nombreux types cellulaires résidant dans la moëlle osseuse, appelées cellules stromales, interviennent également dans le contrôle des CSHs (**Figure 11**) :

- Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSMs) : cette sous-population de cellules stromales, caractérisée par l'expression à leur surface du marqueur Nestine, exprime plusieurs des facteurs impliqués dans la maintenance des CSHs, en particulier CXCL12, Ang-1 et la molécule d'adhésion VCAM1 (Ehninger and Trumpp, 2011; Méndez-Ferrer et al., 2010). Leur déplétion conduit chez la souris à la mobilisation massive des CSHs vers la rate, montrant leur rôle crucial dans le maintien des CSHs dans la moëlle osseuse.
- Les cellules réticulaires abondantes en CXCL12 (CARs) : comme leur nom l'indique, ces cellules expriment un haut niveau de CXCL12. Elles proviennent de la différenciation des CSMs et contribuent au maintien des CSHs dans la niche endostéale, par la production de molécules telles que CXCL12 ou le Stem Cell Factor (Sugiyama et al., 2006).
- Les mégakaryocytes : l'ablation des mégakaryocytes entraîne un défaut de prolifération et d'ancrage des CSHs, restauré par l'administration de Thrombopoïétine (TPO) (Nakamura-Ishizu et al., 2014), suggérant que les mégakaryocytes sont nécessaires au maintien des CSHs, et ceci via la production de TPO.
- Les macrophages : la déplétion des monocytes/macrophages est associée à une mobilisation importante des CSHs hors de la moëlle osseuse. La communication entre macrophages et CSHs passe entre autre par l'interaction CXCL12/CXCR4 (Broxmeyer, 2008; Lapidot and Petit, 2002).
- Le Système Nerveux Périphérique (SNP) : les neurones du système nerveux sympathique régulent la production de CXCL12 par les ostéoblastes (Katayama

et al., 2006). De plus, les cellules de Schwann, cellules gliales du SNP, sécrètent du TGF β , capté par les CSHs via leur récepteur TGF β type 2 receptor et nécessaire à leur maintien (Yamazaki et al., 2011).

-Les adipocytes : le nombre d'adipocytes présents dans la moëlle osseuse augmente avec l'âge. Naveiras et col. (2009) ont montré qu'il existe un rapport inversement proportionnel entre l'activité hématopoïétique et la quantité d'adipocytes dans la moëlle osseuse, suggérant un rôle inhibiteur des adipocytes sur le maintien des CSHs (Naveiras et al., 2009).

Le nombre important de types cellulaires ainsi que de signaux moléculaires impliqués dans le contrôle de l'auto-renouvellement, de la prolifération et de la différenciation des CSHs souligne la grande complexité des interactions mises en jeu. Ces signaux peuvent être modifiés lors d'un stress immun, permettant ainsi une réponse rapide et adaptée du système hématopoïétique.

2) En réponse à un stress hématopoïétique

Lors d'une blessure ou d'une infection, on observe une perte des cellules hématopoïétiques, due à une hémorragie, une mobilisation des cellules immunitaires au niveau du site infectieux ou à leur mort par apoptose en réponse à la présence d'un pathogène (Prendergast and Essers, 2014). Ces cellules doivent rapidement être remplacées. Pour cela, les CSHs, qui restent majoritairement quiescentes en condition « normale », sont alors mobilisées ; c'est-à-dire qu'elles migrent hors de la moëlle osseuse et augmentent leur taux de prolifération et de différenciation, afin de générer de nouvelles cellules sanguines. Ainsi lors d'une anémie, provoquée par exemple par une hémorragie, le taux de production d'érythrocytes est fortement augmenté (Socolovsky, 2007). Des CSHs et des progéniteurs érythroïdes vont pour cela quitter la moëlle osseuse et se différencier massivement en érythrocytes, dans d'autres sites d'hématopoïèse comme la rate. Cette érythropoïèse extra-médullaire n'est observée que lors d'un stress, et fait intervenir les voies de signalisation Bone Morphogenetic Protein (BMP) et Hh ainsi que des signaux moléculaires diffusibles comme l'érythropoïétine et le Stem Cell Factor (SCF) (Lenox et al., 2005; Perry et al., 2007; Perry et al., 2009). L'état activé et hautement prolifératif des CSHs lors d'un stress hématopoïétique est réversible, et les CSHs peuvent ensuite retourner en quiescence (Essers et al., 2009; Trumpp et al., 2010).

a) La réponse de la (des) niche(s) hématopoïétique(s)

Les signaux moléculaires impliqués dans l'activation et la mobilisation des CSHs sont à ce jour peu connus (Trumpp et al., 2010). Expérimentalement, le traitement d'animaux avec du G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) est utilisé pour permettre la mobilisation des CSHs hors de la niche hématopoïétique (Lo Celso and Scadden, 2011; Petit et al., 2002; Trumpp et al., 2010). L'administration de G-CSF conduit en effet à une activation de métalloprotéases qui vont cliver des molécules permettant l'adhésion des CSHs à leur niche, telles que VCAM1, ou impliquées dans la détection de signaux moléculaires, telles que le récepteur CXCR4. Le G-CSF entraîne également une réduction de l'expression de SDF1. Le G-CSF permet donc la mobilisation des CSHs en interférant avec les interactions entre les CSHs et leur niche. L'interféron α (IFN α) est également utilisé expérimentalement pour mobiliser

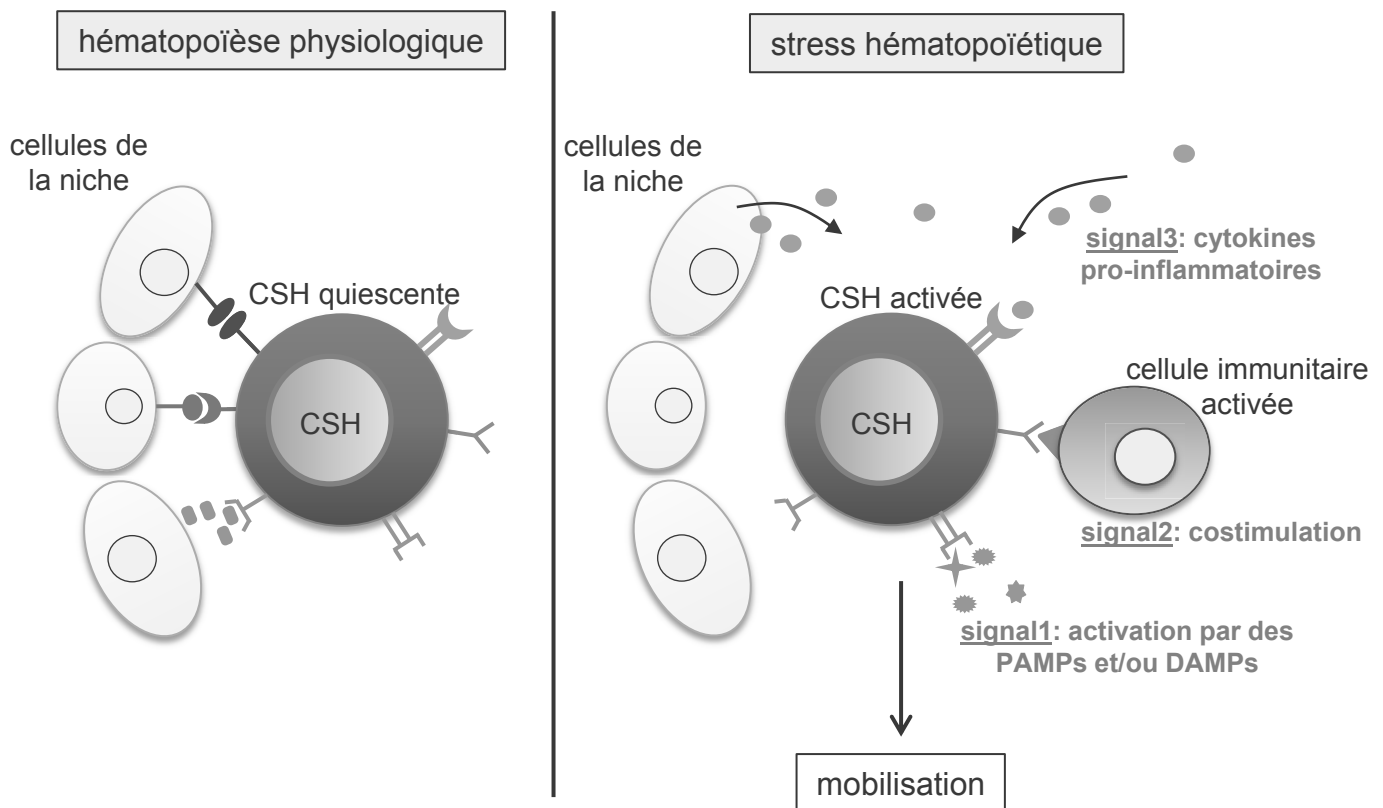


Figure 12 : La mobilisation des CSHs suite à un stress hématopoïétique selon le modèle des trois signaux

En l'absence de stress immunitaire (gauche), les CSHs sont maintenues en quiescence par les cellules de la niche hématopoïétique, via des interactions directes cellule/cellule et des signaux diffusibles. Lors d'un stress hématopoïétique (droite), l'activation des CSHs par la détection directe de motifs microbiens (Pathogen-Associated Molecular Patterns ou PAMPs) ou de débris cellulaires (Danger-Associated Molecular Patterns ou DAMPs) constitue un premier signal favorisant leur mobilisation. La prolifération et la mobilisation des CSHs hors de la moëlle osseuse est également permise par une co-stimulation de la part de cellules immunitaires activées (signal 2) ainsi que la présence de cytokines pro-inflammatoires, provenant à la fois des cellules de la niche et de la circulation systémique (signal 3). L'ensemble de ces trois signaux conduit à une mobilisation des CSHs, qui ne sont plus quiescentes mais activées et sortent de la moëlle osseuse pour se différencier. (adapté de Libregts and Note; 2014)

les CSHs. Il est directement détecté par les CSHs via leur récepteur Sca1 (Essers et al., 2009). L'IFN α est rapidement produit lors d'une infection virale (Broxmeyer et al., 1983), cependant son rôle *in vivo* dans la mobilisation des CSHs suite à une infection n'a pas été clairement établi à ce jour. Récemment, de Bruin et al. ont montré qu'un autre type d'interféron, l'interféron γ (IFN γ) inhibe l'auto-renouvellement des CSHs *in vivo* suite à une infection virale (de Bruin et al., 2013). Des cytokines pro-inflammatoires sont également impliquées dans la mobilisation des CSHs suite à un stress immun, néanmoins leur identification reste encore très succincte. Parmi elles, l'interleukine-1 (IL-1) entraîne une augmentation du facteur de transcription PU.1, conduisant à une différenciation accrue en cellules myéloïdes (Zovein and Forsberg, 2015).

De façon intéressante, les CSHs sont directement capables de reconnaître des motifs microbiens (Pathogen-Associated Molecular Patterns : PAMPs) ou des débris cellulaires (Danger-Associated Molecular Patterns : DAMPs). Elles possèdent en effet des « Pattern Recognition Receptors » (PRRs), récepteurs capables de reconnaître des PAMPs et DAMPs. Par exemple, les CSHs expriment le récepteur TLR4. L'activation de ce récepteur par une stimulation au LPS entraîne l'activation des CSHs, qui de quiescentes deviennent prolifératives (Esplin et al., 2011; Takizawa et al., 2011; Liu 2015). L'activation des CSHs après stimulation au LPS n'a pas lieu dans des souris chimères n'exprimant pas le récepteur TLR4 dans les cellules hématopoïétiques, alors qu'au contraire elle se déroule normalement dans des souris chimères exprimant TLR4 uniquement dans ces cellules, suggérant un rôle de TLR4 uniquement dans les CSHs (Liu 2015). Cependant, cette donnée est en contradiction avec d'autres études proposant un rôle de TLR4 dans les cellules de la niche hématopoïétique (cf introduction II-A-b)).

La niche hématopoïétique intervient également dans l'activation des CSHs. En effet, plusieurs études indépendantes ont montré que le traitement de souris avec de l'IFN γ entraîne une activation de la prolifération des CSHs *in vivo*, tandis que le traitement avec la même molécule de CSHs isolées *in vitro* n'a pas d'effet sur leur taux de prolifération (Baldridge et al., 2010; de Bruin et al., 2013; Essers et al., 2009). Cette donnée suggère que le microenvironnement dans lequel se trouvent les CSHs est crucial dans leur activation en réponse à un stress. Ainsi, l'hématopoïèse suite à un stress pourrait dépendre à la fois de facteurs intrinsèques et extrinsèques

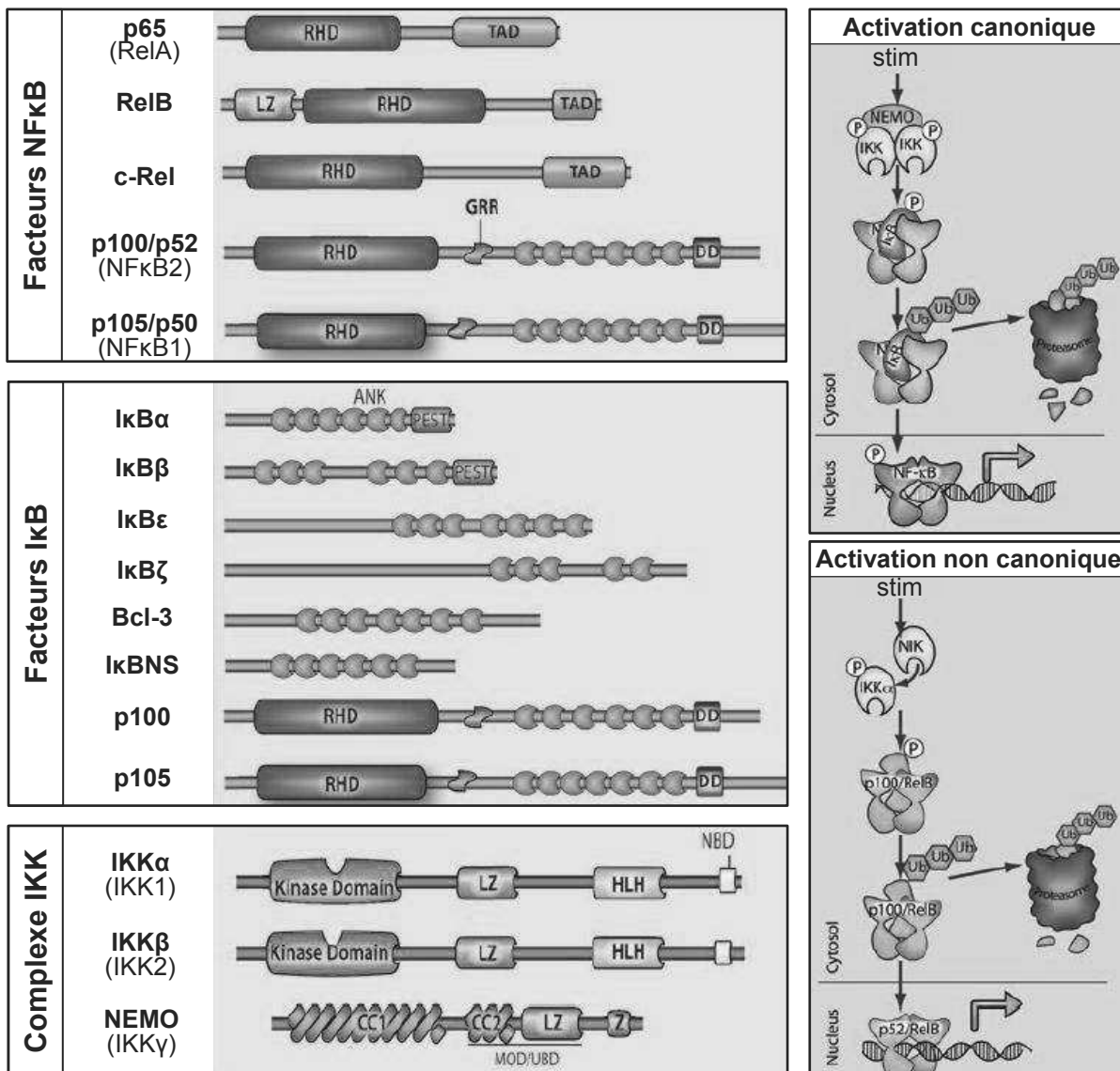


Figure 13 : Les acteurs de la signalisation NFκB chez les mammifères

Chez les mammifères il existe 5 facteurs de transcription NFκB, 8 facteurs IκB ainsi que 3 protéines IKK, formant un complexe. Les domaines protéiques de ces différents facteurs sont indiqués, et leur nom alternatif sont écrits entre parenthèses. Les protéines p100 et p105 sont à la fois des facteurs IκB et, après maturation via le protéasome, des facteurs de transcription NFκB.

L'activation des facteurs NFκB dépend d'une voie canonique ou d'une voie alternative, dont une version très simplifiée est schématisée à droite. Dans la voie canonique, l'activation d'un complexe IKK contenant la protéine NEMO induit la phosphorylation puis la dégradation par le protéasome de IκBα, ce qui entraîne la libération puis la formation de dimères p65-p50. Dans la voie non canonique, l'activation de IKKα est indépendante de NEMO, mais sous le contrôle de la kinase NIK. IKKα et NIK induisent la phosphorylation puis la maturation par clivage de p100 en p52, permettant la formation de dimères p52-RelB.

(ANK: domaine Ankyrine; DD: domaine de mort (Death Domain); RHD: domaine d'homologie REL; TAD: domaine transactivateur; LZ: domaine Leucine-Zipper; GRR: région riche en glycines; HLH: domaine hélice-boucle-hélice; Z: domaine à doigts de zinc; CC: domaine coiled-coil; NBD: domaine d'interaction à NEMO; PEST: domaine riche en prolines, acides glutamiques, sérines et thréonines)

(adapté de Hayden and Gosh; 2011)

aux CSHs, qui à ce jour restent à être identifiés. Libregts et Nolte proposent un modèle de régulation dit « des trois signaux » pour décrire les mécanismes permettant l'activation et la mobilisation des CSHs (**Figure 12** ; Libregts and Nolte, 2014). Selon ce modèle, les CSHs vont tout d'abord détecter des PAMPs et DAMPs de façon directe (signal 1), puis leur co-stimulation par contact avec des cellules immunitaires activées (signal 2) ainsi que la détection de cytokines pro-inflammatoires, émises à la fois par les cellules de la niche et reçues de la circulation sanguine systémique (signal 3), vont aboutir à leur sortie de quiescence ainsi que leur prolifération et différenciation.

b) Les facteurs de transcription NFκB et l'inflammation / la réponse immunitaire

La famille des facteurs de transcription de type « Nuclear Factor κB » (NFκB) comporte cinq membres chez les mammifères, qui interviennent à la fois dans des processus physiologiques et pathologiques (Hayden and Ghosh, 2011). Une voie de signalisation canonique permet leur activation. Dans cette voie, la protéine Inhibitor of NFκB (IκB) séquestre les facteurs de transcription NFκB dans le cytoplasme en absence de stimulation. Suite à un stimulus, par exemple la détection d'un motif microbien, IκB est phosphorylée par le complexe IκB Kinase (IKK), composé des protéines IKKα, IKKβ et NEMO. IκB phosphorylée est dégradée par le protéasome, permettant la libération des facteurs de transcription NFκB, qui peuvent alors entrer dans le noyau et activer, sous forme de dimères, la transcription de leurs gènes cibles. Les processus aboutissant à l'activation des NFκB sont complexes, car il existe huit facteurs IκB différents chez les mammifères, et que des voies de signalisation autres que la voie canonique peuvent également aboutir à leur activation. De plus, de nombreuses protéines de régulation interviennent pour moduler la signalisation NFκB (**Figure 13** ; Ghosh and Hayden, 2008; Hayden and Ghosh, 2011). Les facteurs NFκB jouent un rôle essentiel dans le déclenchement de la réponse immunitaire, innée et adaptative. Par exemple, l'activation des LTs suite à une stimulation de leur TCR est dépendante de l'activité du facteur NFκB p65 (Banerjee et al., 2005). L'activation des NFκB est en particulier cruciale dans la réponse inflammatoire, la transcription de nombreux gènes codant pour des

A

TLR	espèce	localisation	ligands microbiens
TLR1	humain et souris	membrane plasmique	tryacil-lipoprotéines
TLR2	humain et souris	membrane plasmique	lipoprotéines, zymosan, mannan, peptidoglycan, acide lipoteichoïque
TLR3	humain et souris	endosomes	ARN db viral
TLR4	humain et souris	membrane plasmique et endosomes	LPS
TLR5	humain et souris	membrane plasmique	flagelline
TLR6	humain et souris	membrane plasmique	diacyl-lipoprotéines, zymosan, acide lipoteichoïque
TLR7	humain et souris	endosomes	ARN sb viral et bactérien
TLR8	humain et souris	endosomes	ARN sb viral et bactérien
TLR9	humain et souris	endosomes	ADN CpG viral et bactérien, hybrides
TLR10	humain	membrane plasmique	inconnu
TLR11	souris	endosomes	profiline et flagelline
TLR12	souris	endosomes	profiline
TLR13	souris	endosomes	ARN ribosomal 23s bacterien

B

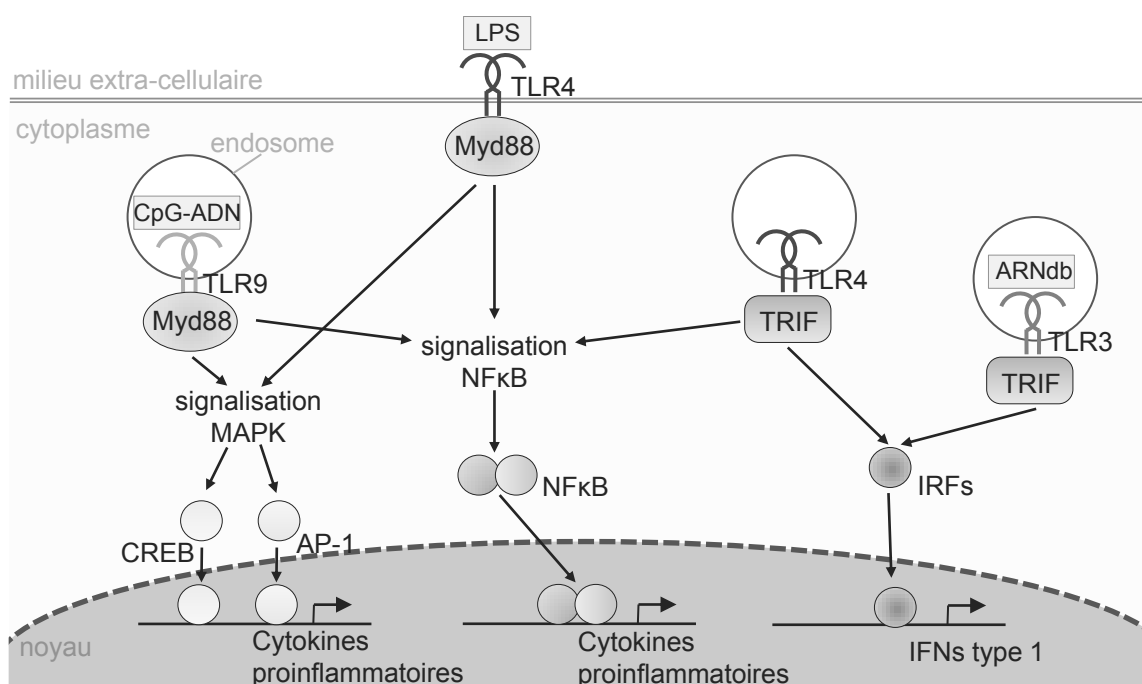


Figure 14 : Activation et signalisation des TLRs

A. Activation, localisation subcellulaire et ligands des TLRs: 10 TLRs ont été identifiés chez l'humain, et 12 chez la souris. Ils sont localisés sur la membrane plasmique et/ou sur la membrane des endosomes. Les TLRs sont activés suite à la détection de motifs microbiens, indiqués dans la colonne de droite.

B. Signalisation des TLRs: plusieurs voies de signalisation et facteurs de transcription peuvent être activés suite à la détection d'un ligand par les TLRs. Les cascades de signalisation en aval des TLRs 9, 4 et 3 sont ici utilisées comme exemple. L'activation des TLR 4 présents à la membrane plasmique ou des TLR9 présents dans les endosomes conduit au recrutement de la protéine adaptatrice Myd88, puis à l'activation des voies de signalisation NFκB et/ou MAPK. Les facteurs de transcription impliqués dans ces voies (NFκB pour la voie NFκB et CREB et AP-1 pour la voie MAPK) contrôlent la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires. L'activation de TLR4 au niveau des endosomes conduit, tout comme l'activation de TLR3, au recrutement d'une autre protéine adaptatrice appelée TRIF, puis à l'activation des facteurs de transcription de type IRF, qui contrôlent la production des interférons de type 1.

(adapté de De Nardo, 2015)

cytokines pro-inflammatoires étant sous le contrôle direct des NF κ B (Ghosh and Hayden, 2008). L'inflammation est une production de signaux moléculaires qui permet le recrutement des cellules immunitaires au niveau du site infectieux et conduit à des changements caractéristiques de l'homéostasie du tissu (chaleur, rougeur, douleur et gonflement) (Hayden and Ghosh, 2011).

Différents stimuli peuvent activer la voie de signalisation NF κ B. C'est en particulier le cas lors de la détection de motifs microbiens par les « Toll Like Receptors » (TLRs). Les TLRs constituent la première famille de PRRs identifiée chez les mammifères, composée de 10 membres chez l'humain et 12 chez la souris (**Figure 14** ; De Nardo, 2015). Ces protéines transmembranaires, localisées soit au niveau de la membrane plasmique, soit au niveau des endosomes, agissent sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimères. Lorsqu'ils sont activés, à la suite de la fixation de leur ligand, certains TLRs recrutent via leur domaine intracellulaire la protéine adaptatrice Myd88, qui va recruter et activer le complexe IKK, et ainsi la voie NF κ B (Burns et al., 1998). Néanmoins l'activation des TLRs ne conduit pas toujours à l'activation des facteurs de transcription NF κ B. D'autres TLRs (ou alors les mêmes dans d'autres conditions) vont, après fixation de leur ligand, recruter une autre protéine adaptatrice appelée « TIR domain-containing adaptator inducing interferon- β » (TRIF). TRIF va ensuite activer les facteurs de transcription Interferon Regulatory Factors (IRFs), qui permettent l'expression de gènes codant pour des interférons de type 1 (**Figure 14** ; Oshiumi et al., 2003; Yamamoto et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). L'un des éléments clés du contrôle de l'activité des TLRs est leur localisation sub-cellulaire. En effet, certains TLRs sont spécifiquement adressés à la membrane plasmique, alors que d'autres sont localisés au niveau des endosomes (Lee and Barton, 2014). L'adressage de ces protéines, contrôlé par la voie classique d'exocytose passant par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi puis les endosomes, est crucial pour permettre la fonction correcte des TLRs. Par exemple, la présence du TLR9 est requise dans les endosomes pour permettre la détection d'acides nucléiques microbiens provenant de pathogènes intracellulaires (Hemmi et al., 2000; Rutz et al., 2004; Yasuda et al., 2006). Enfin, l'activation des facteurs de transcription NF κ B peut avoir lieu indépendamment de l'activation des TLRs (Hayden and Ghosh, 2011).

Le rôle de la signalisation NFκB lors de l'hématopoïèse faisant suite à un stress est aujourd'hui peu documenté. Wang et al. ont montré que dans un mutant perte de fonction du facteur NFκB p50, une forte réduction de la production de neutrophiles induite par un traitement G-CSF est observée, indiquant un rôle de p50 dans la régulation de l'hématopoïèse suite à un stress (Wang et al., 2009). Les auteurs montrent que p50 agit en coopération avec le facteur de transcription C/EBPβ pour activer la production de médiateurs de l'inflammation, qui sont nécessaires à la mobilisation des CSHs et à leur différenciation vers le lignage neutrophile. Dans une autre étude, un régulateur négatif des facteurs NFκB agissant comme déubiquitinyase, la protéine A20, a été décrit comme essentiel au contrôle de l'hématopoïèse (Nagamachi et al., 2014). Le KO conditionnel de A20 dans les CSHs entraîne en effet une prolifération anormale des cellules du lignage myéloïde ainsi qu'une surproduction de cytokines pro-inflammatoires. Ces défauts sont provoqués par une augmentation du taux de prolifération des CSHs, qui perdent alors leur capacité à repeupler la moëlle osseuse d'une souris irradiée. Les auteurs suggèrent que les facteurs NFκB pourraient intervenir lors d'un stress immun pour permettre l'activation et la mobilisation des CSHs, et qu'ils sont réprimés par A20 en contexte « normal ». Les facteurs NFκB jouent donc un rôle dans l'activation des CSHs en réponse à un stress immunitaire, notamment par la production de cytokines pro-inflammatoires nécessaires à leur recrutement. Cependant, la question du rôle des NFκB dans les cellules de la niche hématopoïétique pour le contrôle de l'hématopoïèse physiologique ou suite à une infection n'a pas été adressée.

Les TLRs interviennent également dans le contrôle des changements hématopoïétiques faisant suite à un stress immun. Outre leur rôle cellulaire-autonome dans l'activation des CSHs suite à une stimulation au LPS (cf introduction II-A-2)a)), plusieurs publications suggèrent que les TLRs sont activés dans les cellules de la niche hématopoïétique pour permettre l'activation des CSHs après stimulation. En effet, l'expression de TLR4 dans les cellules de la niche est indispensable à l'augmentation de production des cellules myéloïdes (aussi appelée myélopoïèse d'urgence) observée suite à une stimulation au LPS (Boettcher et al., 2012). En particulier, les cellules endothéliales des vaisseaux de la moëlle osseuse expriment le récepteur TLR4 à un haut niveau, et suite à une stimulation par du LPS produisent du G-CSF, qui va activer la prolifération et la différenciation des cellules

du lignage myéloïdes (Boettcher et al., 2014). Enfin, une infection bactérienne provoque la sortie de la moëlle osseuse de nombreux monocytes. Ce processus nécessite la détection par les monocytes présents dans la moëlle osseuse d'un ligand appelé Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) et produit par les CSMs et les CARs, deux types cellulaires composant la niche hématopoïétique (Shi et al., 2011). La production de MCP-1 est dépendante de la détection par ces cellules de ligands des TLRs, suggérant à nouveau un rôle des TLRs dans certaines cellules de la niche pour permettre les changements hématopoïétiques induits par un stress immun.

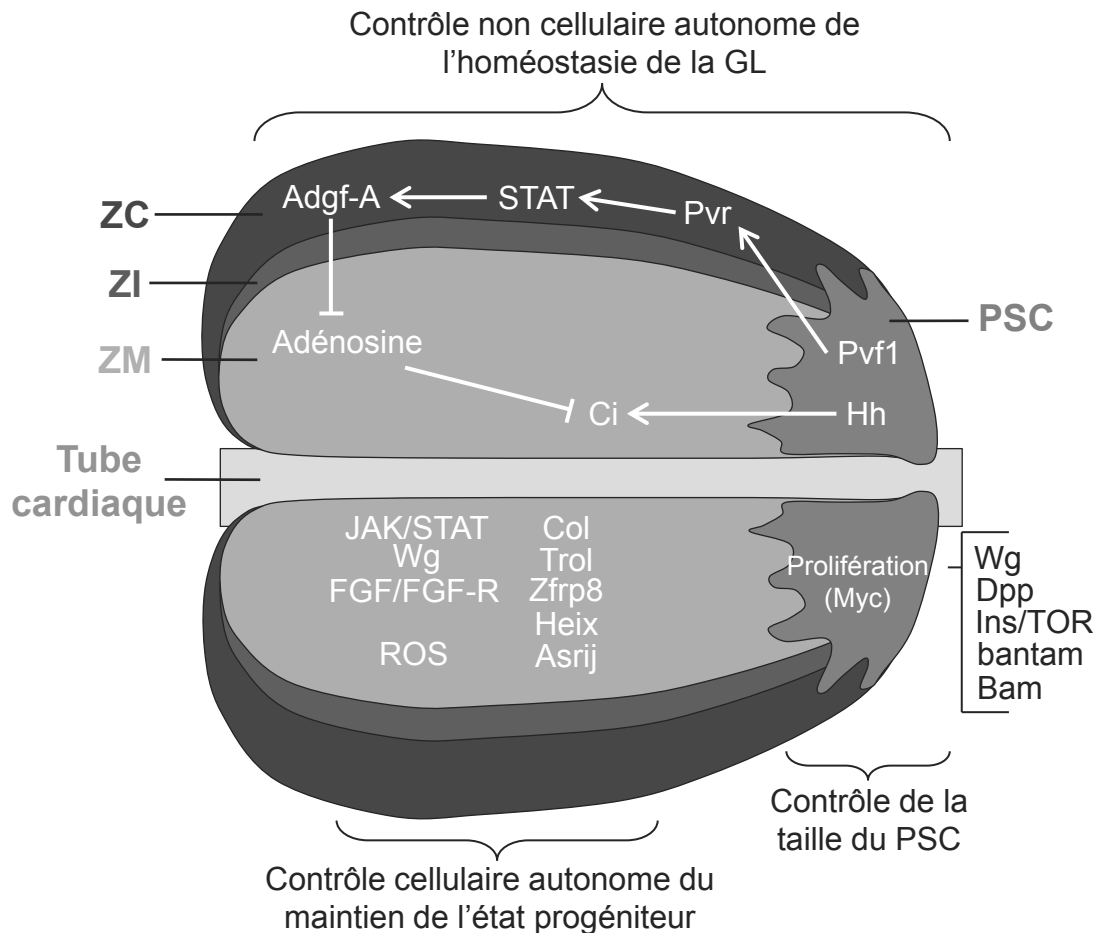


Figure 15 : La régulation de l'homéostasie de la GL

Contrôle non cellulaire autonome de l'homéostasie de la GL: le ligand Hh, produit par le PSC, active la voie Hh et son facteur de transcription effecteur Ci dans la ZM. L'activité de Ci est nécessaire dans la ZM au maintien de l'état progéniteur des prohémyocytes. Le PSC produit également le ligand Pvf1, qui diffuse jusqu'aux cellules de la ZC où il se lie à son récepteur Pvr. L'activité de la voie Pvf1/Pvr dans la ZC entraîne l'expression de la déaminase Adgf-A, via STAT. Adgf-A inhibe dans la ZM l'Adénosine. L'Adénosine est une hormone dont la liaison sur son récepteur dans la ZM conduit à l'inhibition du facteur de transcription Ci. Par le contrôle de l'expression de Ci, la voie Pvf1/Pvr contrôle l'équilibre entre maintien et différenciation des prohémyocytes.

Contrôle cellulaire autonome de l'homéostasie de la GL: les voies de signalisation JAK/STAT, FGF/FGF-R et Wg sont requises dans les progéniteurs hématopoïétiques pour le contrôle de leur maintien versus différenciation. Le niveau de ROS ainsi que les gènes *col*, *trol*, *zfrp8*, *heix* et *asrij* sont également impliqués dans le contrôle de l'homéostasie de la GL.

Contrôle de la taille du PSC: Le contrôle du nombre de cellules du PSC est nécessaire au maintien de l'homéostasie de la GL. Les voies de signalisation Wg, Dpp, Ins/TOR ainsi que le miARN *bantam* et la protéine Bam sont impliqués dans la régulation de la prolifération des cellules du PSC.

(se référer au texte principal pour les références)

B) Chez la drosophile : dans la GL

Comme celui des mammifères, le système hématopoïétique de la drosophile est soumis à des mécanismes de régulation. En particulier, l'homéostasie de la GL, c'est-à-dire le maintien d'un équilibre entre les prohémyocytes de la ZM et les cellules différenciées de la ZC, est un processus finement contrôlé. De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans le contrôle de cet équilibre (**Figure 15**).

1) Le PSC : centre de contrôle de l'hématopoïèse dans la GL

En 2007, deux études indépendantes ont proposé que le PSC joue un rôle clé dans le contrôle de l'homéostasie de la GL, en régulant le maintien et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques de la ZM (Krzemień et al., 2007; Mandal et al., 2007). Le PSC aurait donc un rôle similaire à celui de la niche hématopoïétique décrite dans la moëlle osseuse chez les mammifères adultes. L'une de ces études a mis en évidence le rôle de la voie Hh (Mandal et al., 2007). Le morphogène Hh, ligand de la voie, est exprimé dans le PSC, tandis que le facteur de transcription effecteur de la voie, Cubitus Interruptus (CI) est exprimé dans la ZM. Lorsque la voie est inhibée, soit dans le mutant perte-de-fonction *hh^{ts}*, soit lorsqu'un allèle dominant négatif de *ci* est exprimé dans la ZM, une augmentation du nombre d'hémocytes différenciés présents dans la GL est observée. Les auteurs proposent donc que la voie Hh est nécessaire au maintien des progéniteurs hématopoïétiques de la ZM, et que le PSC, en sécrétant Hh, joue un rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie de la GL (**Figure 15**). Ce rôle de « niche » a également été proposé suite à l'analyse du mutant *col* (Krzemień et al., 2007). Col est exprimé très tôt dans le PSC, dès l'embryogenèse, et son expression y est maintenue au cours des stades larvaires. Dans un mutant nul pour *col*, les cellules du PSC ne sont pas spécifiées au stade embryonnaire. Ce défaut corrèle au stade larvaire avec une différenciation massive des progéniteurs hématopoïétiques de la ZM en plasmotocytes et cellules à cristaux. Il a donc été proposé que le maintien d'un pool de progéniteurs hématopoïétiques indifférenciés dans la GL est compromis en absence de PSC. Cependant, en plus de son expression à haut niveau dans le PSC, Col est aussi exprimé à plus faible niveau dans la ZM. Il a récemment été montré que l'inactivation ciblée de *col* dans les prohémyocytes de la ZM entraîne leur différenciation massive

(Benmimoun et al., 2015; Oyallon et al., soumis). De plus, l'ablation du PSC, par la surexpression du gène pro-apoptotique *reaper* dans ces cellules, n'interfère pas avec l'expression de marqueurs des progéniteurs hématopoïétiques. Cependant, elle conduit à un défaut de différenciation dans la ZC. Des défauts similaires sont observés suite à l'inactivation spécifique de Hh dans le PSC (Tokusumi et al., 2012). Ces données suggèrent donc que le PSC a une fonction plus modérée qu'initialement proposé, en contribuant au contrôle de l'équilibre entre cellules progénitrices et cellules différenciées plutôt qu'en permettant le maintien des progéniteurs de la ZM.

Cependant, il est à noter qu'une augmentation du nombre de cellules du PSC entraîne un changement de l'homéostasie de la GL (Pennetier et al., 2012; Sinenko et al., 2009; Tokusumi et al., 2012). Différents gènes et voies de signalisation interviennent pour contrôler la prolifération des cellules du PSC, et donc le nombre de cellules le composant. (**Figure 15**). Parmi eux, le ligand Wingless (Wg) et le récepteur D-Frizzled2 (DFz12) de la voie Wg sont exprimés dans le PSC (Sinenko et al., 2009). La surexpression de Wg dans le PSC conduit à une augmentation d'un facteur 4 du nombre de cellules du PSC. A l'inverse, l'expression d'une forme dominante négative de *dfz2* dans le PSC conduit à une diminution de moitié de leur nombre. La voie Decapentaplegic (Dpp) est elle aussi requise dans le PSC pour réguler la prolifération de ces cellules. La perte de fonction de la voie Dpp dans le PSC entraîne une augmentation d'un facteur 4 du nombre de cellules qui le composent. Le contrôle de la prolifération des cellules du PSC par la voie Dpp passe par la régulation de l'expression du proto-oncogène *d-myc* (Pennetier et al., 2012). La voie de signalisation Insuline/Target of Rapamycin (Ins/TOR) intervient également dans le contrôle du nombre de cellules du PSC (cf introduction II-B-3 ; (Benmimoun et al., 2012; Shim et al., 2012; Tokusumi et al., 2012). C'est également le cas du micro-ARN *bantam* ainsi que de la protéine Bag of Marble (Bam), qui interagissent avec la voie de signalisation Ins/TOR pour contrôler le nombre de cellules du PSC (Lam et al., 2014; Tokusumi et al., 2015). Lorsque le nombre de cellules composant le PSC est augmenté, lors d'une surexpression de Wg ou d'une inhibition de la voie Dpp dans le PSC par exemple, une augmentation de la taille de la ZM ainsi qu'une diminution du nombre d'hémocytes différenciés dans la ZC est systématiquement observée (Pennetier et al., 2012; Sinenko et al., 2009). Ceci montre que le contrôle

du nombre de cellules du PSC est essentiel au maintien de l'homéostasie de la GL. Ces données sont en accord avec la proposition selon laquelle le PSC agirait comme un centre de contrôle de l'équilibre entre progéniteurs et cellules différenciées.

En plus de son rôle dans le contrôle de l'homéostasie de la GL en absence de stress immun, le PSC joue un rôle crucial lors de la réponse au parasitisme par des guêpes. En effet la production massive de lamellocytes dans la GL après parasitisme n'a pas lieu en l'absence du PSC, observée dans le mutant *col* ou provoquée par la surexpression du gène pro-apoptotique *reaper* dans le PSC, indiquant un rôle essentiel du PSC dans la mise en place de la réponse immunitaire (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007 ; cf introduction III-C-4).

2) Le contrôle intrinsèque de l'homéostasie de la GL par les Zones Médullaire et Corticale (ZM et ZC)

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées de façon cellulaire-autonome dans le contrôle de l'équilibre entre maintien et différenciation des progéniteurs hématopoïétiques de la ZM. C'est le cas de la voie Wg, dont l'activation est nécessaire dans la ZM au maintien de l'homéostasie de la GL (Sinenko et al., 2009). La voie JAK/STAT contrôle également l'homéostasie de la GL. En effet, dans un mutant nul pour le facteur de transcription de cette voie de signalisation, Stat92, une différenciation excessive est observée dans la GL, suggérant un rôle de cette voie dans le maintien des progéniteurs hématopoïétiques (Krzemien et al., 2007). Par génération de clones mutants dans la GL, Mondal et col. (2011) ont montré que cette voie de signalisation n'est pas requise dans les progéniteurs hématopoïétiques de la ZM. Par contre Stat92 est nécessaire dans les cellules de la ZC pour inhiber la différenciation des plasmacytes (Mondal et al., 2011). La voie FGF/FGF-R (Fibroblast Growth Factor / Fibroblast Growth Factor Receptor) est quant à elle requise dans la ZM à la différenciation des prohémostocytes. En effet, l'activation dans la ZM du récepteur Heartless, homologue de FGF-R chez les vertébrés, induit la différenciation des plasmacytes et cellules à cristaux. L'expression de Heartless dans la ZM est dépendante de l'Héparan-Sulfate Protéoglycan Terribly Reduced Optic Lobes (Trol) (Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2013). Dans un mutant nul *trol*, la structure de la matrice extracellulaire entourant la GL est modifiée, et on observe une diminution de la prolifération des cellules de la ZM ainsi qu'une augmentation du nombre d'hémocytes différenciés (Grigorian et al., 2013). Ceci suggère que la matrice extracellulaire est impliquée dans le contrôle de l'homéostasie de la GL. L'homéostasie de la GL est également altérée dans les mutants nuls pour les gènes *zinc finger protein rp8* (*zfrp8*), *heixuedian* (*heix*) ou encore *asrij*, établissant que ces gènes sont requis dans le contrôle de l'homéostasie de l'organe hématopoïétique (Kulkarni et al., 2011; Minakhina et al., 2007; Xia et al., 2015). En particulier, le gène *asrij* code pour une protéine impliquée dans l'endocytose, et contrôle la différenciation des cellules à cristaux en régulant le transport intra-cellulaire de N, nécessaire à la spécification et au maintien de ces cellules. La fonction de Asrij est dépendante de ARF1, une GTPase de la famille Ras avec laquelle Asrij interagit directement (Khadilkar et al., 2014; Kulkarni et al., 2011).

Enfin, le niveau de ROS présent dans la ZM est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie de la GL (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). En effet, un haut niveau de ROS est observé dans la ZM, par comparaison avec la ZC et le PSC, et nécessaire dans les progéniteurs hématopoïétiques pour permettre leur différenciation.

Le maintien de l'homéostasie de la GL est également contrôlé par la ZC. En effet, l'activité de STAT est requise de façon cellulaire-autonome pour permettre la différenciation des plasmacytes (Minakhina et al., 2011). De plus, le ligand PDGFR and VEGFR related factor1 (Pvf1) est exprimé par le PSC, tandis que son récepteur PDGFR and VEGFR related receptor (Pvr) est présent entre autres dans la ZC (Mondal et al., 2011). Les protéines Nucléoporeine 98 (Nup 98) et Bric à brac interacting protein 1 (Bip1) sont toutes deux nécessaires à l'expression de Pvr dans la ZC (Mondal et al., 2014). La liaison Pvf1/Pvr dans la ZC contrôle l'expression d'une déaminase appelée Adenosine Growth Factor A (AdgF-A), via l'activation de STAT. AdgF-A inhibe la concentration extracellulaire de l'Adénosine dans la ZM et agit comme régulateur négatif de la différenciation des proémocytes (Mondal et al., 2011). La fixation de l'Adénosine sur son récepteur dans la ZM conduirait à l'inhibition du facteur de transcription de la voie Hh, Ci, proposé comme crucial dans le maintien des progéniteurs hématopoïétiques dans un état indifférencié (Mandal et al., 2007). Ainsi, l'activité de la voie Pvf1/Pvr fait intervenir les trois zones de la GL pour contrôler l'équilibre entre progéniteurs et hémocytes différenciés dans la GL (**Figure 15** ; Mondal et al., 2011).

Le contrôle de l'homéostasie de la GL est donc particulièrement complexe, et fait intervenir de nombreux acteurs au sein de cet organe.

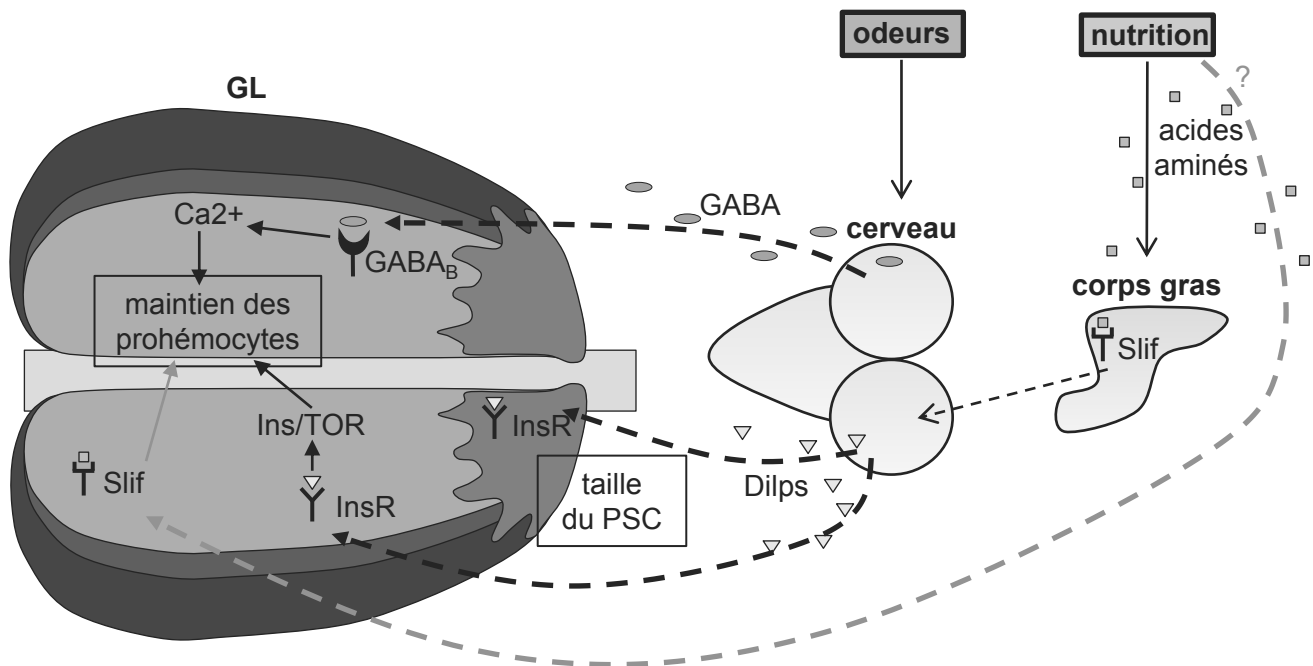


Figure 16 : Les acteurs extrinsèques du contrôle de l'homéostasie de la GL

L'olfaction influence l'homéostasie de la GL: suite à des stimuli odorants, des neurones présents dans le cerveau sécrètent du GABA dans l'hémolymphe. La liaison de GABA sur les récepteurs $GABA_B$ présents dans la ZM entraîne la production de calcium cytosolique. Un niveau élevé de calcium dans les prothémocytes est nécessaire au maintien de leur état progéniteur. (d'après Shim et al., 2013)

La nutrition contrôle l'homéostasie de la GL: le cerveau de la larve produit des peptides équivalents à l'insuline des vertébrés, les Dilps, selon l'état nutritionnel de l'animal. La production de Dilps par le cerveau dépend de la détection d'acide aminés par le corps gras. Dans la GL, la liaison des Dilps sur leur récepteur (InsR) active la voie de signalisation Insuline/Target Of Rapamycine (Ins/TOR), dans la ZM et le PSC. Dans le PSC, la voie Ins/TOR est impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules, et donc de la taille du PSC. Dans la ZM, elle est requise au contrôle de l'équilibre entre maintien et différenciation des prothémocytes. Des acides aminés pourraient également être détectés directement par les prothémocytes, via le récepteur Slimfast (Slif). (d'après Benmimoun et al., 2012 ; Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto 2012 ; Shim et al., 2012 ; Tokusumi et al., 2012).

3) Les acteurs extrinsèques du contrôle de l'hématopoïèse de la GL

L'homéostasie de l'organe hématopoïétique est également dépendante de facteurs externes à celui-ci (**Figure 16**). En particulier, l'état nutritionnel de la larve influence l'homéostasie de la GL. En effet, une privation de nourriture pendant 24H induit une augmentation de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques dans la GL (Benmimoun et al., 2012; Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2012; Shim et al., 2012). La sécrétion de peptides équivalents à l'insuline chez la drosophile, les *Drosophila* insulin-like peptides (Dilps), par des neurones appelés Insulin-Producing Cells (IPCs) présents dans le cerveau est dépendante de l'état nutritionnel des larves (Colombani et al., 2003). Dans la GL, le PSC et la ZM expriment des récepteurs à l'insuline (InsR) capables de lier les Dilps produits par le cerveau (Benmimoun et al., 2012; Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2012). La reconnaissance de Dilps par les InsR active la voie de signalisation Insuline/Target Of Rapamycin (Ins/TOR). L'inhibition de la voie Ins/TOR dans le PSC entraîne une réduction de sa taille, tandis que la surexpression de cette voie dans le PSC conduit à une augmentation du nombre de cellules qui le compose (Benmimoun et al., 2012; Tokusumi et al., 2012), indiquant que la nutrition contrôle l'état prolifératif du centre de signalisation présent dans la GL. Dans la ZM, l'activation de la voie Ins/TOR est nécessaire au maintien cellulaire-autonome des progéniteurs hématopoïétiques : en effet l'inhibition de la voie Ins/TOR dans la ZM conduit à une hyperplasie de la GL et à une augmentation de la différenciation des prohémostocytes (Benmimoun et al., 2012; Shim et al., 2012). La production par le cerveau des Dilps, ligands de voie Ins/TOR, est dépendante de la détection par le corps gras des acides aminés provenant de la nutrition. En effet, l'inhibition du récepteur aux acides aminés Slimfast (Slif) dans le corps gras engendre un phénotype similaire à celui observé en cas de privation de nourriture. Shim et al. proposent que les acides aminés peuvent également être directement détectés par les progéniteurs hématopoïétiques de la ZM, via le récepteur Slif (Shim et al., 2012). Cette dernière donnée est néanmoins controversée, car deux études indépendantes ont analysé l'effet d'une inhibition de *slif* dans la ZM, et ont obtenu des résultats différents : pour Shim et col. (2012), l'inhibition de *slif* dans la ZM conduit à une augmentation de la différenciation des prohémostocytes, tandis qu'elle n'affecte pas l'homéostasie de la GL pour Benmimoun et col. (2012). Ainsi, la nutrition contrôle le maintien/la différenciation des

prohémocytes de la GL, de façon indirecte via le corps gras et le cerveau ; et possiblement aussi par la détection directe des acides aminés présents dans l'hémolymphe par les progéniteurs hématopoïétiques.

L'olfaction est également impliquée dans le contrôle de l'homéostasie de la GL (Shim et al., 2013). Certaines odeurs entraînent la sécrétion d'acide γ -aminobutyrique (GABA) par des neurones du cerveau. La détection de GABA par les progéniteurs hématopoïétiques de la ZM, qui expriment le récepteur au GABA appelé GABA_B, entraîne une augmentation du niveau de calcium cytosolique dans ces cellules. Un haut niveau de calcium est nécessaire au maintien des prohémocytes.

Enfin, l'homéostasie de la GL est dépendante du taux d'oxygène (Mukherjee et al., 2011). Le facteur de transcription Sima, orthologue du médiateur clé des réponses à l'hypoxie chez les vertébrés, Hif- α , est en effet exprimé dans les cellules à cristaux, où il active l'expression du récepteur N, requis à la spécification et la maintenance de ces cellules. L'absence de Sima en conditions de normoxie conduit à une perte des cellules à cristaux. En conditions d'hypoxie, Sima est stabilisé dans les cellules à cristaux, ce qui conduit à une augmentation du nombre de cellules à cristaux différenciées dans la GL. Ceci indique que le taux d'oxygène peut également affecter l'homéostasie de la GL.

L'homéostasie de la GL, et plus généralement celle du système hématopoïétique de la drosophile, est donc finement régulée au cours du développement. En absence de stress immun, elle est régulée par un ensemble de facteurs extrinsèques et intrinsèques. En réponse à un stress immun, cette homéostasie est complètement modifiée, afin d'adapter la production de cellules immunitaires, acteurs clés de la réponse immunitaire, aux besoins immédiats de l'organisme.

III. La réponse immunitaire chez la drosophile

La drosophile, comme la plupart des organismes vivants, possède la capacité de distinguer ce qui est étranger à son propre corps, le « non soi », de ce qui en fait partie, le « soi ». Une infection va ainsi déclencher de la part de l'hôte une défense immunitaire ayant pour but l'élimination ou la neutralisation du pathogène qui en est la cause. Contrairement aux vertébrés, la drosophile ne possède pas de cellules de type lymphocytes ni de répertoire de récepteurs d'antigènes hautement spécifiques et ne peut donc pas mettre en place de défense immunitaire adaptative. Seul le système immunitaire inné est responsable de la réponse immunitaire de la drosophile et lui permet de lutter efficacement contre de nombreux types de pathogènes. Ainsi, différents organismes pathogènes (bactéries, champignons, virus ou parasites) vont activer la réponse immunitaire innée, qui cependant sera différente et adaptée au pathogène mis en cause.

La première ligne de défense contre une infection est une barrière physique : il s'agit des épithélia qui tapissent les voies d'entrée du corps de l'animal. La cuticule de l'animal ainsi que les épithélia présents dans le tractus digestif, les voies génitales ou encore la trachée sont ainsi essentiels pour empêcher l'entrée de micro-organismes dans la cavité du corps de l'insecte (pour revue : Charroux and Royet, 2010). Le franchissement de ces barrières et la détection d'un micro-organisme pathogène va entraîner la mise en place d'une réponse immunitaire, composée de deux axes : la réponse humorale systémique, qui consiste principalement en la sécrétion dans l'hémolymph de molécules à activité anti-microbienne ; et la réponse cellulaire, qui met en jeu des cellules spécialisées requises pour l'élimination/la neutralisation de pathogènes, les hémocytes.

A) L'immunité humorale

L'immunité humorale permet la production de molécules diffusibles et cytotoxiques pour les micro-organismes et agit à deux niveaux :

-Au niveau local : les épithélia produisent des molécules anti-microbiennes afin d'éliminer les pathogènes avant leur entrée dans le corps de l'hôte. Cette réponse contribue efficacement à la protection de la drosophile contre des infections bactériennes et fongiques (pour revue : Lemaitre and Hoffmann, 2007).

-Au niveau systémique : le Corps Gras (CG), large tissu d'origine mésodermique localisé dans la cavité du corps de la drosophile adulte ou de la larve, permet la production massive de peptides anti-microbiens (AMPs), qui sont ensuite sécrétés dans l'hémolymphe. De façon intéressante, les molécules anti-microbiennes ainsi que les voies de signalisation conduisant à leur production sont différentes selon le type de pathogène impliqué. Les acteurs moléculaires mis en jeu ne sont en effet pas les mêmes lors d'une infection par une bactérie à Gram positif ou à Gram négatif, par un virus ou par un champignon, illustrant une spécificité dans la réponse immunitaire.

1) La réponse antibactérienne et antifongique

La réponse immunitaire humorale mise en place pour lutter contre les bactéries ou les champignons consiste en la production massive de peptides anti-microbiens (AMPs), principalement par le corps gras mais également par les hémocytes circulants. Cette réponse a été décrite pour la première fois en 1972 par Hans Boman et ses collègues dans une publication dans le journal Nature (Boman et al., 1972). Les auteurs y décrivent une expérience clé qui leur a permis de démontrer l'existence d'une réponse humorale chez la drosophile : ils montrent qu'une pré-injection de bactéries mortes dans le corps de drosophiles leur permet de survivre à une deuxième infection bactérienne normalement létale. La protection conférée aux insectes est en fait due à la présence d'AMPs, dont la sécrétion massive par le corps gras a été induite lors de l'injection des bactéries mortes (Boman et al., 1972). Sont désignés sous le terme d'AMP de petites protéines d'une taille en générale inférieure

à 10kDa et présentant une activité antibactérienne et/ou antifongique. Chez la drosophile il existe une vingtaine d'AMPs différents, regroupés en sept classes, qui ne sont pas produits en réponse aux mêmes microorganismes (Lemaitre and Hoffmann, 2007) :

- les Diptericines, Attacines et Drosocines permettent la lyse des bactéries Gram négatives
- les Défensines agissent contre les bactéries Gram positives
- les Drosomycines et Metchnikowin ciblent les champignons
- les Cécropines, premiers AMPs identifiés, sont actifs à la fois contre les bactéries et les champignons.

En plus des AMP, d'autres molécules à activité anti-microbienne ont été montrées comme induites en réponse à une infection: c'est par exemple le cas d'un transporteur de fer (Yoshiga et al., 1999) et d'un gène codant pour une Catalase (De Gregorio et al., 2001), qui ciblent respectivement le fer et la balance RedOx, tous deux essentiels au développement des micro-organismes. Ainsi, la présence de micro-organismes dans le corps de l'insecte déclenche la libération d'un arsenal de molécules anti-microbiennes, différent selon le type de pathogène impliqué.

La détection des pathogènes passe par la reconnaissance de motifs microbiens par des récepteurs soit solubles, soit présents à la membrane des cellules du corps gras ou des hémocytes, appelés les Pattern Recognition Receptors (PRRs). Il existe deux familles principales de PRRs chez la drosophile : les Peptidoglycan Recognition Proteins (PGRPs), qui reconnaissent le peptidoglycan des bactéries, à savoir des polymères gluco-peptidiques présents à leur surface ; et les Gram Negative Binding Proteins (GNBPs), capables de se lier à la surface de certains champignons (Ganesan et al., 2011). La capacité de la drosophile à mettre en place une réponse immunitaire différente selon le type de pathogène, et en particulier de bactéries, repose sur la détection des types de peptidoglycans spécifiquement présents à la surface des bactéries Gram-positives ou Gram-négatives (Guan et al., 2004; Leulier et al., 2003).

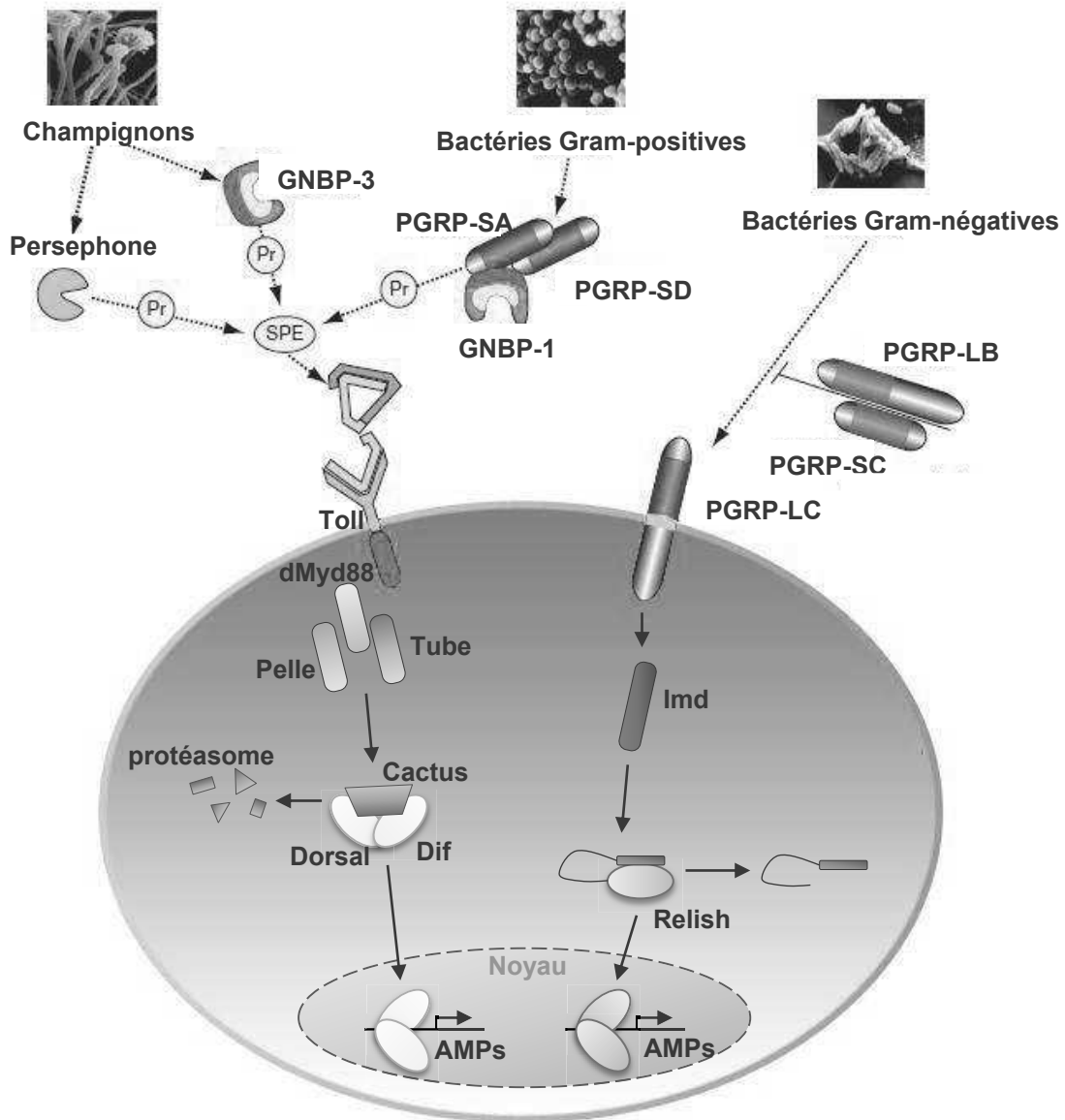


Figure 17 : Les voies de signalisation Toll/NFκB et IMD et la réponse immunitaire humorale contre les bactéries et champignons

Les bactéries Gram-positives sont reconnues par les récepteurs solubles PGRP-SA, GNB-1 et PGRP-SD, ce qui conduit à une cascade protéolytique aboutissant au clivage de Spätzle (Spz) par la sérine-protéase Spätzle Processing Enzyme (SPE). La détection de champignons par GNB-3 entraîne également l'activation de SPE. D'autres champignons activent la voie Toll/NFκB via la sécrétion de protéases, dont l'action va aboutir au clivage de Spz. La forme clivée de Spz se lie sous forme de dimère au récepteur Toll, permettant l'activation de la voie de signalisation Toll/NFκB. Une cascade de phosphorylation impliquant les protéines Myd88, Tube et Pelle aboutit à la phosphorylation de Cactus, puis à sa dégradation par le protéasome. La dégradation de Cactus permet la libération des facteurs de transcription à domaine REL Dif et Dorsal, qui peuvent alors entrer dans le noyau et activer la transcription de leurs gènes cibles, dont plusieurs codent pour des Peptides Anti-Microbiens (AMPs).

Les bactéries Gram-négatives sont détectées par le récepteur membranaire PGRP-LC, qui reconnaît des composants présents à leur surface, entraînant l'activation de la voie de signalisation Immune Deficiency (IMD). Le recrutement du facteur Imd, puis l'activation d'une cascade de phosphorylation aboutissent au clivage du domaine inhibiteur de Relish, le troisième facteur de transcription à domaine REL de la drosophile. Une fois clivé Relish entre dans le noyau et active la transcription de ses gènes cibles.

(d'après Lemaître and Hoffmann, 2007 et Hetru and Hoffmann, 2009)

La reconnaissance d'un motif microbien par les PRRs entraîne l'activation de l'une de ces deux voies de signalisation : la voie Toll, correspondant à la signalisation NFκB chez les vertébrés, ou/et la voie Immune Deficiency (IMD) (**Figure 17** ; Lemaitre and Hoffmann, 2007). Les PRRs solubles PGRP-SA, PGRP-SD et GGBP1, après détection de motifs de surface des bactéries Gram-positives, activent la voie de signalisation Toll/NFκB. Celle-ci est également activée après détection de champignons par des PRRs de type GGBP. Plus précisément, ces PRRs vont, après fixation d'un motif microbien, activer une cascade protéolytique impliquant des Sérines Protéases (SP), qui va aboutir à la maturation par clivage du ligand de la voie Toll/NFκB, Spätzle (Spz). Spz clivé se lie à son récepteur, Toll, présent en particulier à la membrane des cellules du corps gras, ce qui aboutit à l'activation de la voie Toll/NFκB et à la production d'AMPs, cibles directes de cette voie. La voie IMD est quant à elle activée directement par la liaison de bactéries Gram-négatives à des PRRs de type PGRP ancrés à la membrane. Comme la voie Toll/NFκB, la voie IMD active directement la transcription de gènes codant pour des AMPs.

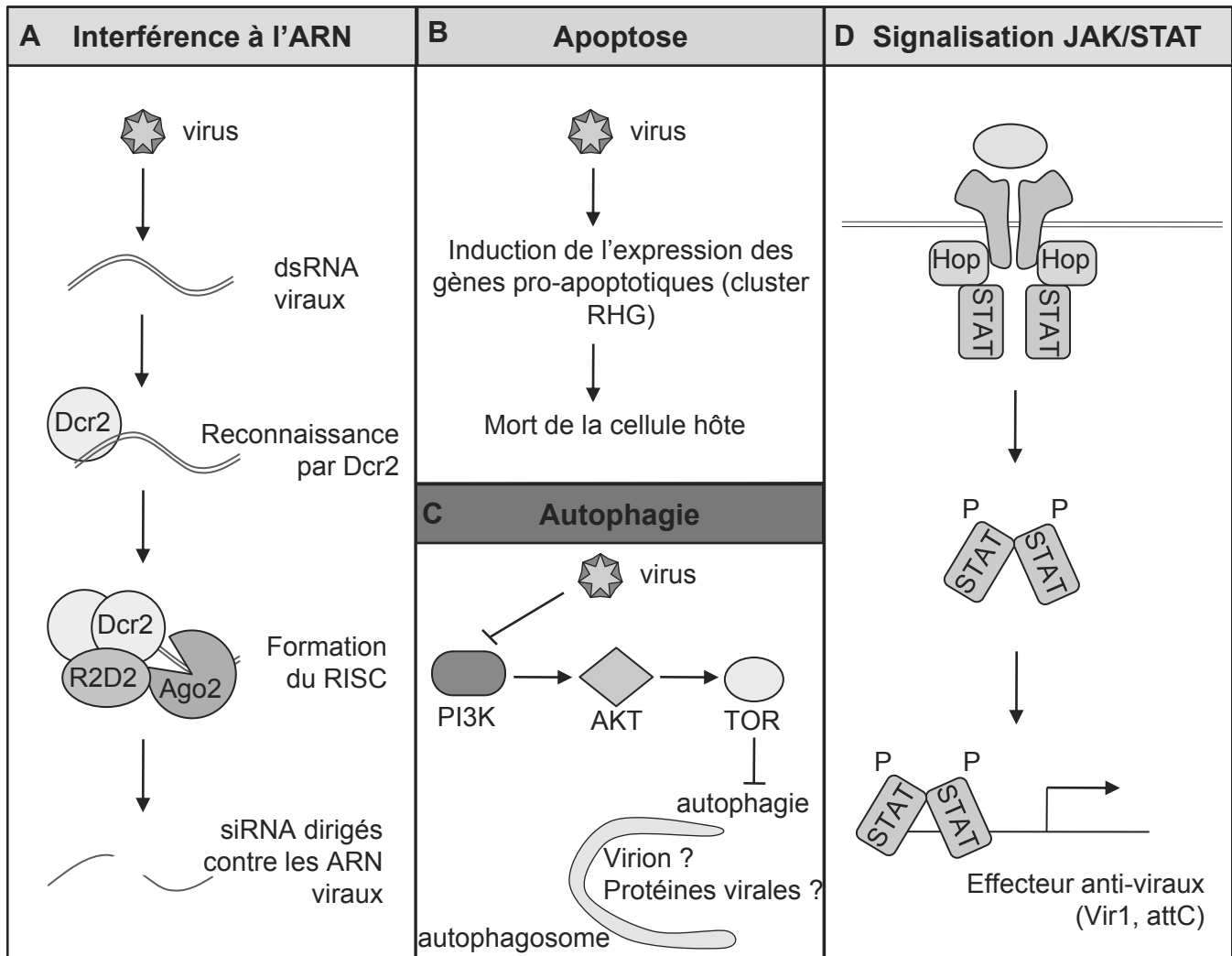


Figure 18 : La réponse immunitaire antivirale

Plusieurs mécanismes sont mis en jeu lors de la réponse immunitaire contre les virus :

- A. l'interférence à l'ARN permet la production de siRNA dirigés contre les ARN viraux
- B. l'apoptose détruit la cellule infectée et empêche la propagation du virus
- C. l'autophagie, mettant en jeu la voie PI3K/AKT/TOR, permet la destruction d'une partie du matériel cytosolique
- D. l'activation de la voie JAK/STAT entraîne la transcription de gènes effecteurs anti-viraux par la cellule infectée.

(adapté de Lamiable and Imler, 2014)

2) La réponse antivirale

Les virus utilisent les composants intracellulaires de l'hôte qu'ils infectent pour permettre la réplication de leur matériel génétique. Si certains virus infectent spécifiquement les insectes, d'autres sont transmis aux vertébrés par les insectes, en particulier par les moustiques. Ainsi, comprendre comment la réponse antivirale agit chez les insectes représente un enjeu médical important pour l'humain. Plusieurs mécanismes de défense antivirale sont mis en jeu chez les insectes en général et chez la drosophile en particulier (**Figure 18**). Le plus important d'entre eux est médié par l'interférence à l'ARN. Ce processus permet de générer des petits ARN interférents, les siRNA (small interfering RNA) à partir d'ARN double-brin (dsRNA) d'origine virale pour permettre leur dégradation et ainsi inhiber la réplication virale (Kingsolver et al., 2013). La détection du virus passe par la reconnaissance de dsRNA viraux, produits lors de la réplication du génome viral, par la protéine Dicer2. Dicer2 va, avec l'aide de son co-facteur R2D2, permettre le recrutement de la protéine Argonaute2 (Ago2) au sein du complexe RISC (RNA Induced Silencing Complexe). Dans le RISC, la protéine Ago2, qui est une RNase, clive les dsRNA en petits ARNs de 21nt, les siRNA, dont l'homologie de séquence avec les ARNs viraux permet leur reconnaissance et leur dégradation. Lors d'une infection virale, des drosophiles mutantes pour Dicer2 ou pour Ago2 ne parviennent pas à bloquer la réplication virale et résistent donc beaucoup moins bien que des animaux contrôles (Galiana-Arnoux et al., 2006; van Rij et al., 2006; Wang et al., 2006; Zambon et al., 2006). En plus des siRNA, d'autres petits ARN transcrits à partir du génome cellulaire, les PIWI-RNA (piRNA) sont impliqués dans la réponse antivirale chez la drosophile. En effet, lorsque la voie de synthèse des piRNA est inhibée, la quantité de virus Semliki Forest Virus (SFV) qui s'accumule dans le corps de l'hôte est supérieure à ce que l'on observe dans des drosophiles contrôles infectées, révélant l'importance des piRNA dans la réponse antivirale (Morazzani et al., 2012).

Deux autres mécanismes cellulaires sont impliqués dans la réponse anti-virale : l'apoptose et l'autophagie. Concernant l'apoptose, elle est induite par la présence de virus particuliers tels que le Flock House Virus (FHV) et permet de réduire leur accumulation (Settles and Friesen, 2008). L'autophagie, processus qui conduit à la destruction de matériel cytosolique dans les lysosomes, a quant à elle été montrée comme impliquée dans le contrôle de l'infection par plusieurs virus : le Vésiculaire

Stomatitis Virus (VSV), le Rift Valley Fever Virus (RVFV) ou encore le virus Sigma (Magwire et al., 2012; Moy and Cherry, 2013; Moy et al., 2014; Shelly et al., 2009). L'activation de l'autophagie lors d'infections virales passe par la répression de la signalisation PI3kinase/AKT/TOR (Shelly et al., 2009). En l'absence d'infection, cette voie inhibe l'autophagie.

Enfin, plusieurs voies de signalisation participent à la réponse immunitaire antivirale. Parmi elles, la voie JAK/STAT est nécessaire à la réponse immunitaire contre certains virus, dont entre autres le Drosophila C Virus (DCV). Des drosophiles mutantes pour la kinase Hopscotch (Hop), composant canonique de la voie JAK/STAT, présentent en effet une susceptibilité accrue au DCV (Dostert et al., 2005). De façon intéressante, une infection par le DCV entraîne la sécrétion par le corps gras de Vago, un polypeptide riche en cystéines. La production de Vago est ici dépendante de la présence de Dicer2 (Deddouche et al., 2008). Chez le moustique *Culex*, une infection par le virus West Nile Virus (WNV) entraîne également la production de l'orthologue de Vago (CxVago) (Paradkar et al., 2012). CxVago permet l'activation chez ce moustique de la voie JAK/STAT, indépendamment du récepteur classique de la voie, Dome. Paradkar et al. proposent alors que Vago pourrait jouer le rôle de cytokine anti-virale et activer la voie JAK/STAT par un récepteur autre que Dome. La conservation de ce mécanisme chez la drosophile n'a pas été démontrée. Enfin, les voies de signalisation Toll/NFκB et IMD, centrales dans la réponse immunitaire contre les bactéries et champignons, jouent également un rôle dans la réponse antivirale. Par exemple, des drosophiles mutantes pour certains composants de la voie Toll/NFκB sont plus susceptibles à une infection par les virus DENV ou DXV (Zambon et al., 2005) tandis que la voie IMD est nécessaire pour lutter contre des infections par les virus Cricket Paralysis Virus (CrPV) et SINV (Avadhanula et al., 2009; Costa et al., 2009).

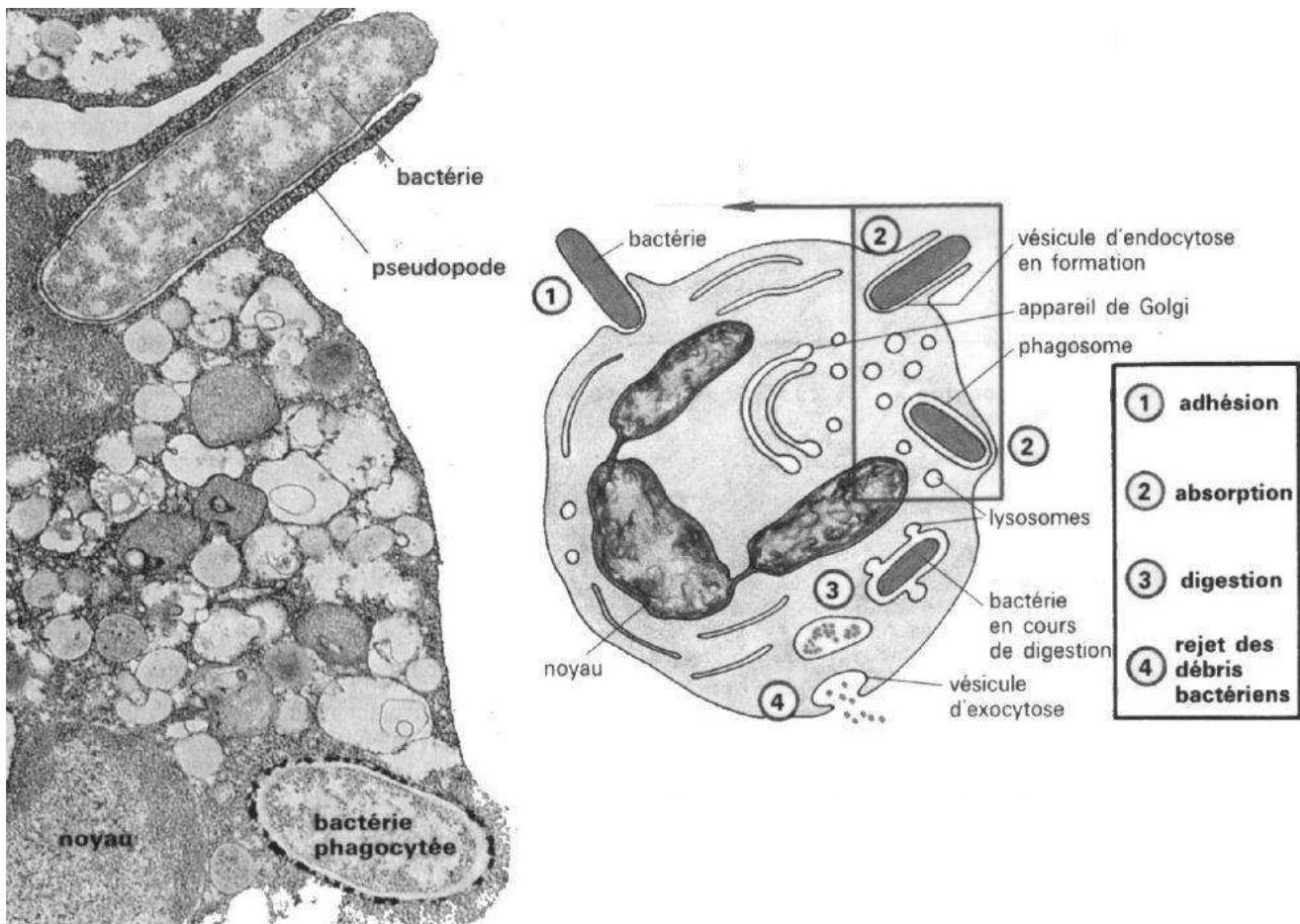


Figure 19 : La phagocytose

L'élimination de microorganismes pathogènes par phagocytose se déroule en plusieurs étapes: le pathogène est tout d'abord détecté par contact par le macrophage, puis adhère à sa surface (étape 1: adhésion). Il va ensuite entrer dans le phagocyte par déformation de la membrane plasmique de celui-ci, et se trouve alors inclus dans une vacuole appelée phagosome (étape 2: absorption). Le phagosome va fusionner avec des lysosomes, dont le contenu très acide va permettre la dégradation du microbe (étape 3: digestion). Les résidus de digestion seront ensuite éliminés hors de la cellule par exocytose (étape 4: rejet des résidus microbiens).

(image extraite de <http://imagesbiogeolfxm.free.fr/immuno/thumb.html>)

B) L'immunité cellulaire

1) La phagocytose

La phagocytose consiste en la destruction d'un corps (débris cellulaire ou pathogène) par « ingestion » dans une cellule. Certaines cellules immunitaires sont spécialisées dans ce processus : les plasmotocytes dans le cas de la drosophile. La phagocytose se déroule en plusieurs étapes : la reconnaissance de la particule à détruire, suivie de son ingestion par le plasmotocyte et enfin sa destruction (**Figure 19**). Plusieurs récepteurs exprimés à la surface des plasmotocytes et nécessaires à la reconnaissance de l'objet à phagocyter ont été identifiés :

- La reconnaissance des débris cellulaires résultant de l'apoptose développementale implique les récepteurs Croquemort (Franc et al., 1999), Draper (Manaka et al., 2004) et NimC4 / Simu (Kurant et al., 2008).
- Le récepteur Draper est aussi impliqué dans la reconnaissance de pathogènes (Manaka et al., 2004). Les molécules de surface Eater et NimC1, appartenant à la famille Nimrod, sont quant-à-elles essentielles à la reconnaissance des bactéries par les plasmotocytes (Kocks et al., 2005; Kurucz et al., 2007). Leur inhibition dans les plasmotocytes conduit en effet à un défaut d'élimination des bactéries par phagocytose. Récemment il a été montré que Eater est requis uniquement pour la phagocytose des bactéries Gram positives, et n'intervient pas dans la phagocytose des bactéries Gram négatives (Bretscher et al., 2015). Enfin, la protéine Dscam a également été proposée comme nécessaire à la phagocytose de pathogènes (Watson et al., 2005). Cette protéine sécrétée dans l'hémolymph appartient à la superfamille des immunoglobulines et existe sous de nombreuses isoformes (18000 isoformes potentielles), ce qui pourrait lui conférer la capacité de reconnaître une grande variété de pathogènes. L'inhibition de Dscam spécifiquement dans les hémocytes diminuerait leur taux d'élimination de bactéries par phagocytose (Watson et al., 2005).

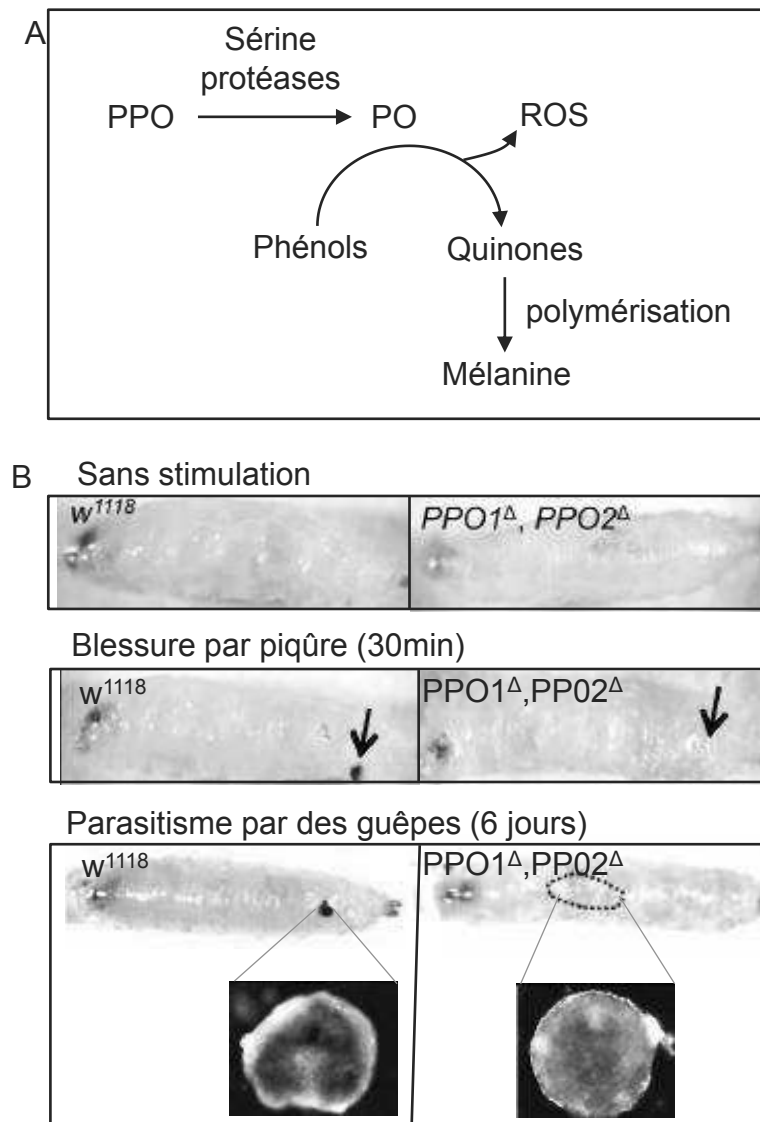


Figure 20 : La mélanisation

A. La cascade enzymatique responsable de la production de mélanine: lors d'une blessure ou d'un challenge immunitaire, la mélanisation est l'une des réponses immunitaires mises en place par la drosophile pour se défendre. Les Pro-Phénol Oxydases (PPOs), contenues dans le cytoplasme des cellules à cristaux et libérées dans l'hémolymphe, sont maturées en Phénol Oxydases (POs) par des Sérine protéases. Les POs convertissent des composés phénoliques en quinones, dont la polymérisation permet la formation de mélanine. Les réactions enzymatiques conduisent à la formation de ROS.

B. Le rôle des PPOs 1 et 2 dans la mélanisation après blessure ou après parasitisme: 30 minutes après blessure de larves de drosophiles sauvages avec une aiguille stérilisée, une accumulation de mélanine est visible au niveau du point de piqûre (flèche). Le point de piqûre n'est par contre pas mélanisé après blessure de larves mutantes pour *ppo1* et *ppo2*, indiquant que ces deux enzymes sont impliquées dans la mélanisation. Dans des larves sauvages, 6 jours après parasitisme par des guêpes, les œufs de guêpe encapsulés sont mélanisés. En revanche, aucune mélanisation n'est visible autour des œufs de guêpe dans des larves mutantes pour *ppo1* et *ppo2* après parasitisme. Ainsi PPO1 et 2 sont requises à la mélanisation observée lors de l'encapsulation.

(images extraites de Binggeli et al., 2014)

2) La mélanisation

La mélanisation est un type de défense immunitaire caractéristique des arthropodes. Elle est principalement opérée par les cellules à cristaux et consiste en la formation dans l'hémolymphe de dépôts noirs de mélanine (**Figure 20**). Ces dépôts permettent la cicatrisation, en créant une barrière physique au lieu de la blessure, empêchant ainsi l'entrée de pathogènes dans le corps de la larve. La mélanisation est aussi directement toxique pour les pathogènes. La cascade de mélanisation a été bien décrite (RIZKI and RIZKI, 1959) : lors d'une infection ou d'une blessure, la voie JNK va entraîner la rupture de la membrane des cellules à cristaux (Bidla et al., 2007), provoquant ainsi la libération dans l'hémolymphe de Prophénoloxydases (PPOs), enzymes stockées dans le cytoplasme sous forme inactive. Les PPOs vont alors être maturées par une cascade moléculaire impliquant différentes sérines protéases, pour *in fine* activer la Phénoloxydase (PO). La fonction de la PO est l'oxydation de phénols en quinones, qui une fois polymérisés forment la mélanine. Cette réaction d'oxydation génère la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS, molécules directement cytotoxiques. Il existe trois PPOs chez la drosophile, dont deux (PPO1 et PPO2) sont exprimées dans les cellules à cristaux et une (PPO3) dans les lamellocytes (Irving et al., 2005; Nam et al., 2008). Dans le mutant appelé Black cell (Bc), généré par exposition à l'EMS et décrit en 1980 (Rizki et al., 1980), une mélanisation anormale des cellules à cristaux est observée. La mutation Bc est en fait une substitution d'un résidu Alanine en Valine dans le gène codant pour la PPO1, qui affecte le site de clivage de l'enzyme, causant une activation constitutive de la protéine (Neyen et al., 2015).

Chez la larve la mélanisation a également lieu lors de l'encapsulation de pathogènes. En effet, les particules encapsulées sont noires, de par la présence de mélanine. Les lamellocytes, acteurs majeurs de l'encapsulation, expriment la PPO3. Une hypothèse était donc que la mélanisation lors de l'encapsulation pouvait être due non seulement aux cellules à cristaux, qui sont recrutées autour de l'objet indésirable, mais aussi aux lamellocytes. Néanmoins, la mélanisation après encapsulation des œufs de guêpes est abolie dans le double mutant *ppo1-ppo2*. Les PPO 1 et 2 étant spécifiquement exprimées par les cellules à cristaux, ce résultat montre que les cellules à cristaux sont requises à la mélanisation des capsules après parasitisme (Binggeli et al., 2014).

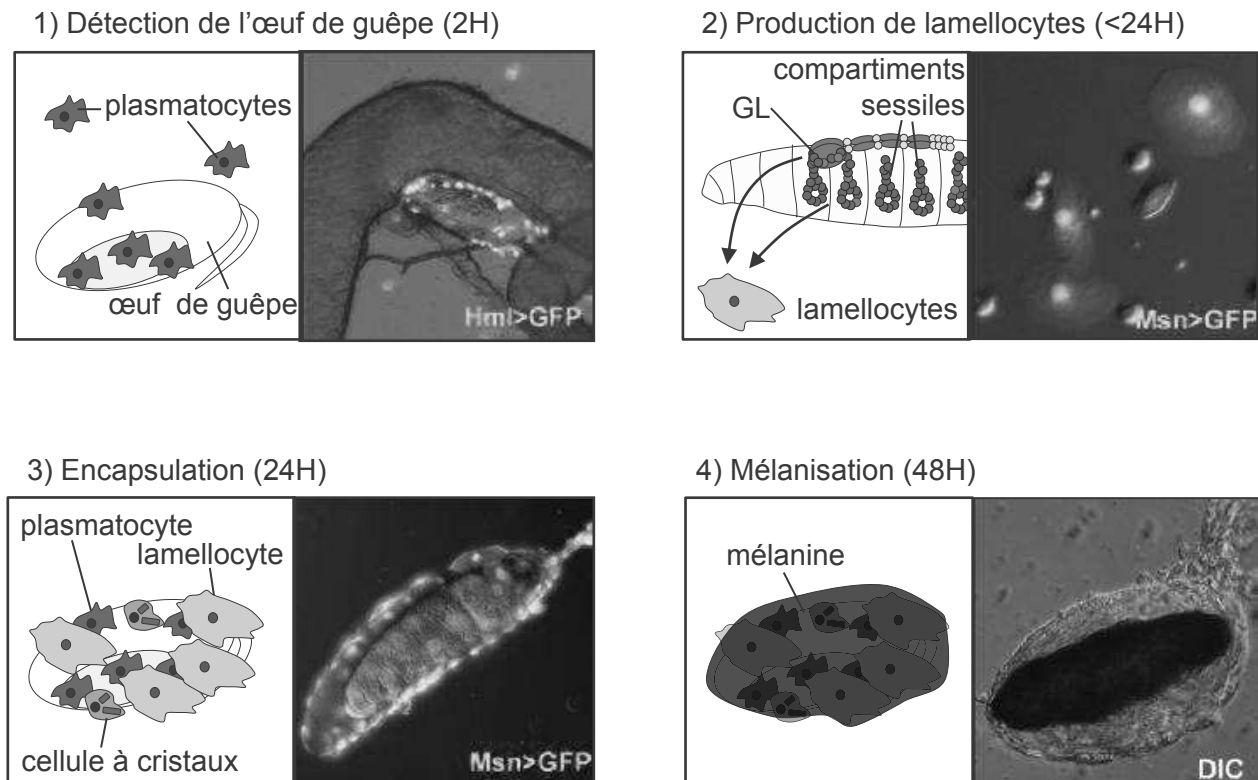


Figure 21 : L'encapsulation

L'encapsulation de corps étrangers, sur ce schéma d'un œuf de guêpe, se déroule en plusieurs étapes :

- 1) La présence du corps étranger dans la larve est détecté par les plasmatocytes en circulation, ici marqués par la GFP dirigée sous le contrôle du pilote d'expression Hml-Gal4.
- 2) Des lamellocytes vont se différencier à partir des deux compartiments hématopoïétiques larvaires, la GL et le compartiment sessile; puis vont être libérés dans la circulation lymphatique. Les lamellocytes en circulation sont visualisés par l'expression de la GFP sous le contrôle du pilote Msn-Gal4, spécifique des lamellocytes.
- 3) Les lamellocytes forment une capsule autour de l'œuf de guêpe. Ils sont visualisés par l'expression de Msn>GFP
- 4) 48H après parasitisme la capsule est mélanisée. L'encapsulation aboutit *in fine* à la mort de l'œuf.

(images extraites de Bajgar et al., 2015)

3) L'encapsulation

Le terme d'encapsulation désigne la formation autour de l'objet à éliminer d'une capsule constituée de plusieurs couches de cellules immunitaires. Ce processus permet la neutralisation de corps trop gros pour être phagocytés, comme c'est par exemple le cas pour les œufs de guêpes parasitoïdes pondus dans les larves de drosophile. Cette réponse n'est néanmoins pas spécifique au parasitisme, puisqu'elle est également observée lorsque l'on injecte une gouttelette d'huile dans l'hémolymphe d'une larve (Dubuffet et al., 2008). L'encapsulation fait appel à une coopération des trois types de cellules immunitaires présents chez la drosophile (**Figure 21**). Les plasmotocytes présents dans la circulation lymphatique détectent l'objet indésirable puis s'agglutinent autour pour former la première couche cellulaire de la capsule (Russo et al., 1996). Suite à cette étape, une différenciation massive de lamellocytes est observée dans la GL. Les lobes primaires de la GL vont se désagréger pour libérer les lamellocytes dans la circulation lymphatique (Lanot et al., 2001). Des lamellocytes sont également produits à partir des compartiments sessiles (Márkus et al., 2009). Les lamellocytes vont à leur tour s'agglutiner à l'œuf de guêpe et consolider la capsule (Vlisidou and Wood, 2015). L'adhérence des lamellocytes à l'œuf nécessite l'intégrine Myosphéroïde (Irving et al., 2005). La capsule, formée d'une multi-couche de cellules immunitaires, va ensuite être mélanisée, par l'action des cellules à cristaux. La cascade de mélanisation ainsi que la production de molécules cytotoxiques comme les ROS vont concourir à la neutralisation du pathogène (Nappi et al., 2009).

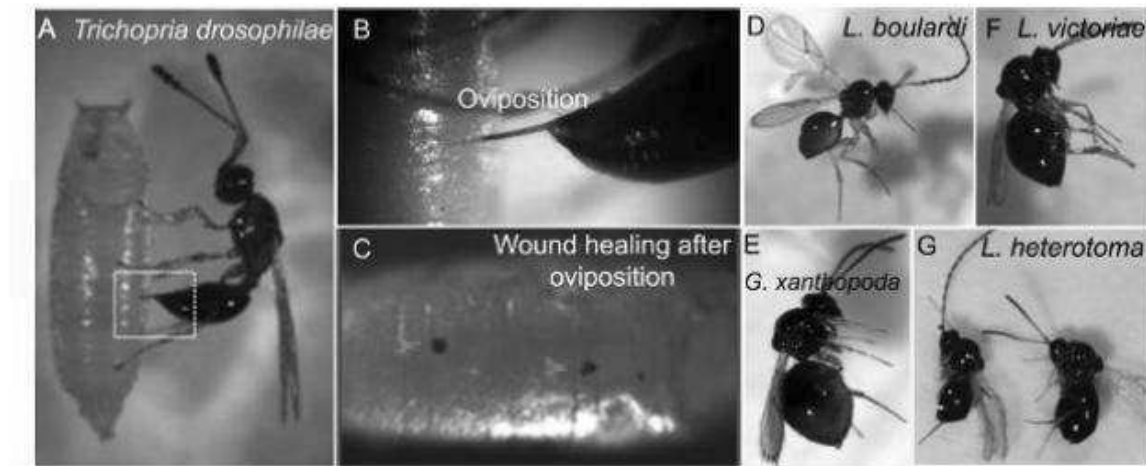


Figure 22 : Exemples de guêpes parasitoïdes

La guêpe *Trichopria drosophilae* pond ses œufs dans des pupes de drosophile (A). Un grossissement du site d'oviposition est montré en B. Le point de piqûre est visible grâce à la mélanisation obtenue après cicatrisation (C). Les guêpes *Leptopilina bouardi* (D), *Ganaspis xanthopoda* (E), *Leptopilina victoriae* (F) et *Leptopilina heterotoma* (G) sont d'autres espèces de guêpes parasitoïdes, qui parasitent les larves de différentes espèces d'insectes. (Small et al., 2012)

C) Le cas du parasitisme par des guêpes

Les insectes sont confrontés à de nombreuses menaces, parmi lesquelles se trouvent les guêpes parasitoïdes. Ces guêpes pondent leurs œufs dans le corps de l'hôte, le plus souvent lors de son stade larvaire ou pupal (**Figure 22** ; Small et al., 2012). Ces guêpes constituent un danger immédiat et vital pour l'insecte infecté. En effet, quand l'œuf de guêpe éclot il donne naissance à une larve qui se nourrit du corps de son hôte, entraînant sa mort. Pour se défendre, l'hôte met en place une réponse immunitaire afin de neutraliser l'œuf de guêpe avant son éclosion. Néanmoins cette réponse est parfois insuffisante ou trop tardive et ne peut empêcher l'éclosion de l'œuf de guêpe. Ainsi, l'issue de la lutte entre le parasite est l'organisme infecté est incertaine. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'interaction entre hôte/pathogène existant entre la mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster*, et l'un de ses parasitoïdes naturels, la guêpe *Leptopilina boulardi*.

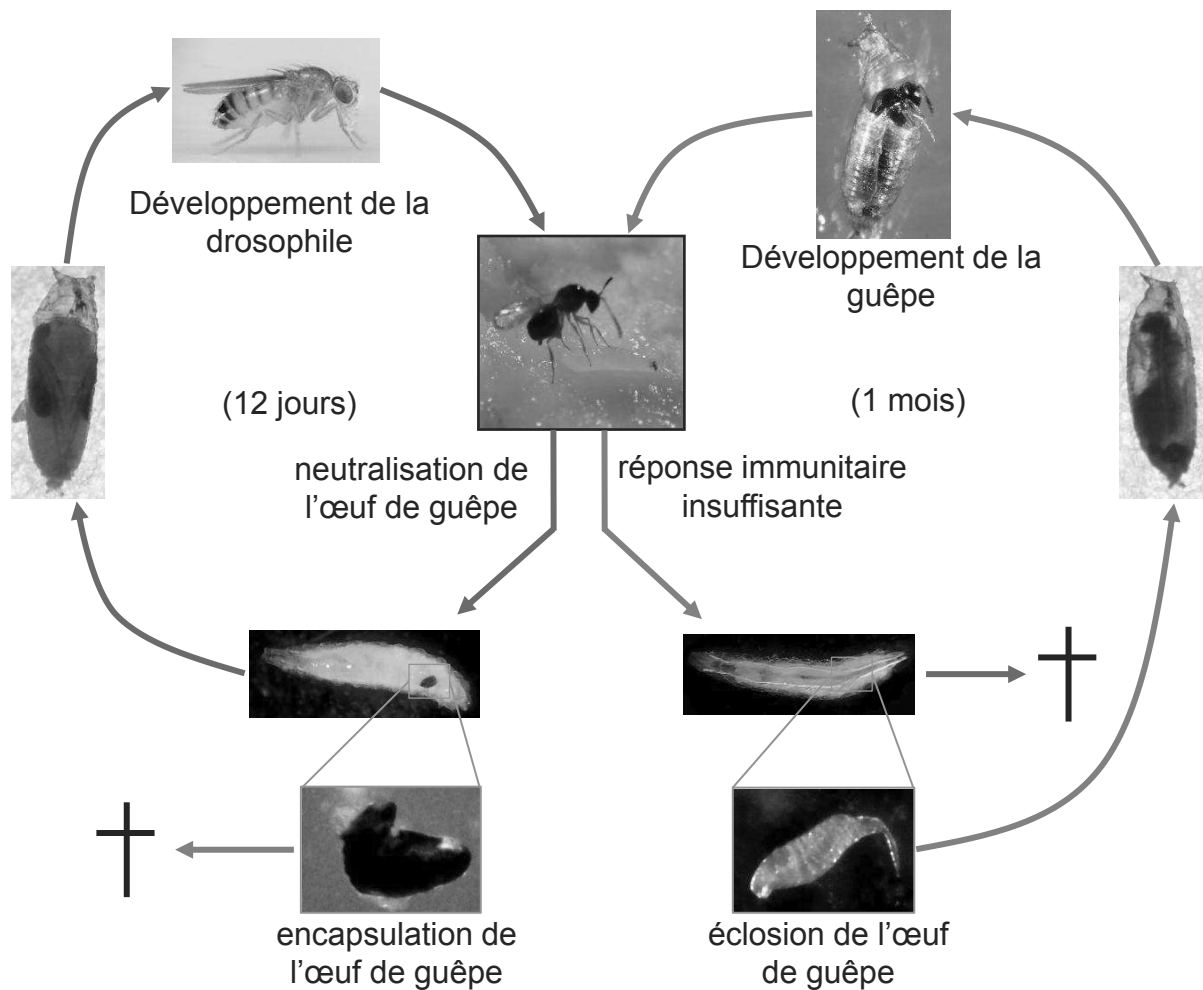


Figure 23 : Le cycle de vie de la guêpe *Leptopilina boulardi*

La guêpe pond un œuf dans la larve de drosophile au deuxième stade larvaire (L2). Si la réponse immunitaire mise en place par la larve de drosophile est suffisante, l'œuf de guêpe est neutralisé par encapsulation et meurt. La larve infectée continue alors son développement, entre en pupaison puis devient après la métamorphose une drosophile adulte. L'œuf mélanisé persiste comme un corps inerte dans le corps de la drosophile (cycle bleu).

Si la réponse immunitaire de l'hôte n'est pas efficace ou trop tardive, l'œuf de guêpe n'est pas encapsulé et va éclore pour donner une larve. Celle-ci va se nourrir du corps de son hôte, entraînant la mort de celui-ci. Le parasite continue son développement jusqu'à devenir une guêpe adulte, environ un mois après le parasitisme (cycle rouge).

1) Le cycle de vie de la guêpe parasitoïde *Leptopilina boulardi*

La guêpe *Leptopilina boulardi* parasite la drosophile au deuxième ou au début du troisième stade larvaire (L2-eL3). La femelle pond ses œufs dans le corps de la larve à l'aide d'un organe appelé ovipositeur localisé du côté postérieur de son abdomen : cette étape s'appelle par extension l'oviposition. *Leptopilina boulardi* est un parasite obligatoire, c'est-à-dire qu'elle ne pond jamais ses œufs sur un substrat inerte, mais uniquement dans le corps d'un hôte. De plus, le terme parasitoïde signifie que l'hôte et le pathogène ne peuvent pas survivre ensemble. Deux issues sont donc possibles suite à l'oviposition (**Figure 23**) :

- Si la larve de drosophile développe une réponse immunitaire suffisamment efficace et précoce, le développement de l'œuf de guêpe va être stoppé. Dans ce scénario, la larve de drosophile poursuit son développement et l'œuf de guêpe, encapsulé, meurt et reste comme un corps inerte dans la drosophile.
- Si par contre la réponse immunitaire est insuffisante, ou trop tardive, l'œuf de guêpe va éclore pour donner naissance en environ 24H à 25°C à une larve de guêpe. Celle-ci va se nourrir des tissus de son hôte, et ainsi entraîner sa mort. Ici seul le parasite survit et continue son développement, jusqu'à donner une guêpe adulte après environ un mois à 25°C.

La lutte entre la drosophile et la guêpe est donc un combat d'où il ne peut sortir qu'un seul vainqueur, et chacun des deux acteurs dispose de différentes stratégies pour espérer le gagner.

2) La réponse immunitaire au parasitisme

Il est crucial pour la survie de la larve de drosophile de se défendre, rapidement et efficacement, contre le parasitisme par des guêpes. L'encapsulation constitue la réponse immunitaire mise en place en ce sens (cf introduction III-B-3). Elle met en jeu la production massive, puis la libération dans la circulation lymphatique, de lamellocytes à partir de la GL et des compartiments sessiles (Márkus et al., 2009). Néanmoins, la larve de drosophile met en place d'autres mécanismes de défense, qui ont pour but d'éviter d'être parasité ou de permettre de « soigner » la larve infectée (Keebaugh and Schlenke, 2014).

Ainsi, il a été observé que lorsqu'elles sont attaquées par des guêpes, les larves de drosophile ont une réponse comportementale d'évitement : en roulant sur elles-mêmes, elles diminuent l'efficacité de l'oviposition et donc le risque d'être parasitées. Cette réponse est dépendante de neurones nocicepteurs de classe IV du système nerveux périphérique (Hwang et al., 2007). De plus, il a été noté que l'hémolymph de larves parasitées a un contenu en alcool supérieur aux contrôles (Milan et al., 2012). Les drosophiles vivant dans des fruits en décomposition, elles sont en présence de produits de fermentation. Les auteurs proposent que l'alcool pourrait être utilisé par les larves comme médication pour favoriser l'élimination du pathogène. Le taux de survie des parasites est en effet moins important lorsque les larves de drosophile sont nourries avec un milieu contenant de l'alcool. De façon intéressante, quand des drosophiles adultes sont en présence de guêpes, elles ont tendance à pondre leurs œufs sur des substrats contenant de plus hauts niveaux d'alcool, ce qui permettrait de protéger leur descendance (Kacsoh et al., 2013). Ce comportement est associé à une réduction de la quantité de neuropeptide F dans une région du cerveau, le « fan-shaped body ». Enfin, en présence de guêpes parasitoïdes, les drosophiles femelles réduisent leur taux de ponte, dans l'attente de jours meilleurs (Lefèvre et al., 2012).

Finalement, en plus de ces différents comportements vis-à-vis du parasitisme par les guêpes, une protection supplémentaire peut être apportée aux larves parasitées par la présence d'un micro-organisme. En effet, la présence de *Spiroplasma*, bactérie à transmission maternelle symbiote de *Drosophila hydei*, protégerait les larves de cette espèce de drosophile contre le parasitisme par des guêpes (Xie et al.,

2011; Xie et al., 2010). Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont actuellement pas connus.

Stratégie de virulence		Guêpe(s) utilisant cette stratégie	Facteur(s) de virulence impliqué(s)
Evasion immunitaire passive			
Parasitisme d'hôtes immunodéficients ou trop jeunes pour mettre en place une réponse immunitaire		<i>Trichogramma spp.</i> <i>Asobara tabida</i> (hôte: <i>D. subobscura</i>)	— —
Oviposition dans des tissus inaccessibles aux cellules immunitaires		<i>Asobara tabida</i> (hôte: <i>D. melanogaster</i>)	Propriétés adhésives du chorion
Caractéristiques de surface de l'œuf empêchant la mise en place de la réponse immunitaire	Protection au niveau de l'œuf	<i>Copidosoma floridanum</i> <i>Macrocentrus cingulum</i> <i>Toxoneuron nigriceps</i> <i>Cotesia kariyai</i> <i>Cotesia rubecula</i> <i>Venturia canescens</i>	Membrane extra-embryonnaire ? Chorion Protéine du Calyx IEP Protéine du Calyx Crp32 VLPs; haemomucine...
	Protection au niveau de la larve	<i>Leptopilina boulardi</i> <i>Cotesia congregata</i> <i>Chelonus inanitus</i> <i>Venturia canescens</i>	? ? ? haemomucine
Suppression active de la réponse immunitaire			
Modification de la réponse immunitaire cellulaire	Apoptose	<i>Leptopilina heterotoma</i> <i>Cotesia kariyai</i> <i>Cotesia congregata</i> <i>Microplitis demolitor</i>	? Venin, CkPDV CcPDV MdPDV
	Modification de l'organe hématopoïétique	<i>Leptopilina heterotoma</i> <i>Leptopilina victoriae</i> <i>Ganaspis xanthopoda</i> <i>Cotesia kariyai</i> <i>Asobara citri</i>	? ? ? CkPDV ?
	Modification du cytosquelette et/ou des propriétés adhésives des hémocytes	<i>Leptopilina heterotoma</i> <i>Leptopilina boulardi</i> <i>Cotesia rubecula</i> <i>Microplitis demolitor</i> <i>Campoletis sonorensis</i> <i>Venturia canescens</i>	VLPs VLPs, LbGAP (RhoGAP) CrPDV : protéine CrV1 MdPDV Protéines ovariennes, CsPDV: protéine VHv1.1 Composants du Calyx sans VLP
Inhibition de la cascade de mélanisation		<i>Leptopilina boulardi</i> <i>Cotesia congregata</i> <i>Cotesia rubecula</i> <i>Microplitis demolitor</i> <i>Asobara tabida</i> et <i>citri</i> <i>Campoletis sonorensis</i> <i>Venturia canescens</i>	Venin, Serpine SPNy CcBV Venin, Sérine protéase Vn50 MdPDV, Smapine, venin ? CsPDV Composants du Calyx sans VLP

Figure 24 : Le contournement de la réponse immunitaire de l'hôte par des guêpes parasitoïdes

Liste non exhaustive des stratégies de virulence utilisées par les guêpes parasitoïdes pour contourner la réponse immunitaire de leur hôte. VLPs : Virus Like Particles. PDV : polydnavirus. Les PDV sont indiqués par les initiales de leur nom latin suivi de « PDV ».

(traduit et adapté de Poirié et al., 2009; se référer au texte principal et à la revue de Poirié et al., 2009 pour les références)

3) Le contournement de la réponse immunitaire de la drosophile par le pathogène

Au cours de l'évolution sont apparues chez différentes espèces de guêpes parasitoïdes différentes stratégies pour contourner la réponse immunitaire de leur hôte. La mise en place au cours de l'évolution de mécanismes de défense immunitaires de plus en plus perfectionnés par l'hôte, en parallèle de l'évolution de stratégies de contournement de la réponse immunitaire par le pathogène s'appelle co-évolution antagoniste (Keebaugh and Schlenke, 2014). Ces stratégies peuvent correspondre à de l'évasion immunitaire passive, où la présence du pathogène n'est pas détectée et n'induit donc pas de réponse immunitaire, ou à un mécanisme actif de suppression immunitaire, par des facteurs de virulence produits par le pathogène et inhibant cette réponse (**Figure 24** ; Mortimer et al., 2013; Schlenke et al., 2007).

Concernant l'évasion immunitaire passive, les guêpes *Asobara tabida* et *Ganaspis sp1* pondent par exemple des œufs présentant de fortes propriétés adhésives. Ainsi ces œufs se trouvent enfouis dans les tissus de l'hôte et sont plus difficilement détectés par les hémocytes circulants requis dans la détection du pathogène (Eslin and Prévost, 2000; Mortimer, 2013).

Les différentes stratégies de suppression immunitaire reposent quant à elles sur la présence de facteurs de virulence, injectés par la femelle guêpe lors de l'oviposition et produits par des glandes à venin ou glandes annexes qui sécrètent leur contenu dans le tractus génital (Asgari and Rivers, 2011; Colinet et al., 2013). Ces facteurs peuvent être des protéines sécrétées, des particules virales (polydnavirus), ou bien des particules de type viral mais ne contenant pas d'acide nucléique et appelées en conséquence « Virus Like Particules » (VLP) (Poirié et al., 2009). Parmi les facteurs de virulence sécrétés se trouve la protéine vSERCA, produite par la guêpe *Ganaspis sp1*, qui présente une forte homologie de séquence avec la pompe calcique SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase). En diminuant le niveau de calcium dans l'hémolymphe, vSERCA empêche la migration des plasmatocytes vers l'œuf de guêpe. Une augmentation du niveau de calcium cytoplasmique est en effet nécessaire dans les plasmatocytes pour permettre leur migration après parasitisme (Mortimer et al., 2013). L'un des facteurs de virulence les mieux décrits est la protéine de type RhoGap appelée LbGap,

provenant du venin de la guêpe *Leptopilina boulardi*. En interagissant dans les lamellocytes avec les GTPases Rac1 et Rac2, LbGap modifie la morphologie de ces cellules (Colinet et al., 2007; Labrosse et al., 2005). Les propriétés adhésives des lamellocytes sont également altérées par des facteurs de virulence présents dans le venin des guêpes *Leptopilina boulardi* et *heterotoma*. Ces facteurs de virulence modifient en effet la glycosylation des protéines de surface de ces cellules, interférant ainsi avec leur fonction (Mortimer et al., 2012). De plus, le venin de certaines guêpes contient des facteurs inhibiteurs des différentes voies de signalisation mises en jeu dans la réponse au parasitisme (Schlenke et al., 2007). Le venin des guêpes *Leptopilina boulardi* et *Leptopilina heterotoma* contient par exemple des facteurs capables d'inhiber la cascade de mélanisation ayant lieu lors de l'encapsulation (Colinet et al., 2011; Colinet et al., 2009). En effet, le venin de ces deux espèces de guêpes contient une SuperOxide Dismutase (SOD), capable d'inhiber *in vitro* l'activité des PO de drosophile (Colinet et al., 2011). Certains facteurs de virulence conduisent à un déficit du nombre de cellules immunitaires présentes dans l'hémolymphe, en causant leur mort par apoptose ou en empêchant la différenciation des lamellocytes (Chiu and Govind, 2002; Morales et al., 2005; Rizki and Rizki, 1990). Le génome de certains polydnavirus code pour des protéines à domaine Ankyrine appelées Vankyrines, homologues à la protéine Cactus, régulateur négatif de la voie Toll/NFκB, mais dépourvues des séquences régulatrices de cette protéine (Gueguen et al., 2013). De par leur structure, les Vankyrines pourraient séquestrer les facteurs de transcription à domaine Rel de la voie Toll/NFκB par liaison directe, empêchant ainsi leur translocation nucléaire et l'activation de la voie de signalisation Toll/NFκB. L'expression ectopique de ces Vankyrines dans les hémocytes de la larve de drosophile affecte l'activation de la voie Toll/NFκB dans ces cellules et altère la formation de capsules suite au parasitisme. Les auteurs proposent que la perturbation de l'activité de la voie NFκB lors du parasitisme par des guêpes pourrait contribuer au succès du parasitisme *in vivo* (Gueguen et al., 2013).

Au sein d'une même espèce de guêpe, il peut exister différentes souches. En particulier, il existe des souches virulentes et d'autres avirulentes de *Leptopilina boulardi*. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé la souche avirulente G486 comme modèle

de pathogène pour étudier la réponse immunitaire de la larve de drosophile au parasitisme par des guêpes.

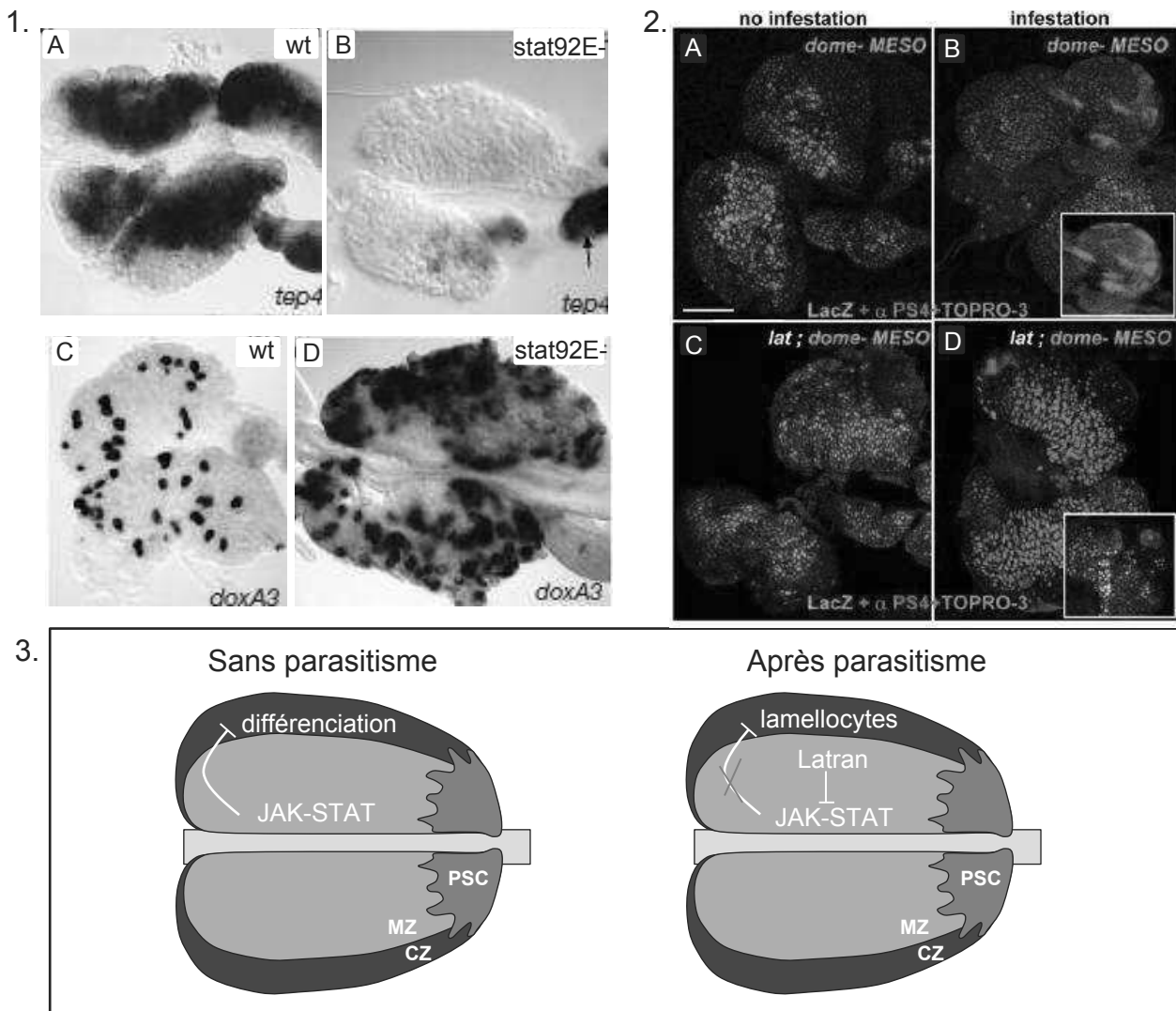


Figure 25 : Rôles de la voie JAK/STAT dans la GL

- L'activité de la voie JAK/STAT est nécessaire au maintien de l'homéostasie de la GL en absence de parasitisme:** dans la GL de larves mutantes *stat92E-* (B), on observe une perte du marquage *tep4*, exprimé dans les progéniteurs hématopoïétiques, par rapport au contrôle (A); ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules à cristaux, visualisées par le marqueur *dox43* (C-D). Ces résultats indiquent que la voie JAK/STAT est requise au maintien des progéniteurs hématopoïétiques dans la ZM (images extraites de Krzemien et al., 2007).
- La voie JAK/STAT est inactivée dans la ZM suite au parasitisme par des guêpes:** le marqueur *dome-MESO* (vert), décrit comme un rapporteur de l'activité de la voie JAK/STAT, est exprimé dans la ZM dans des larves sauvages et dans des larves mutantes pour *latran* (A-C). 24H après parasitisme par des guêpes, l'expression de *dome-MESO* est fortement réduite dans la ZM dans les larves sauvages, et une différenciation importante de lamellocytes (marquage α -PS4; rouge) est observée dans le contrôle (B). Dans le mutant *latran*, l'expression du marqueur *dome-MESO* (vert) n'est pas modifiée après parasitisme et seuls quelques lamellocytes se différencient (rouge) (D). Ces données suggèrent que l'inactivation de la voie JAK/STAT dans la ZM est nécessaire à la différenciation massive de lamellocytes en réponse au parasitisme; et que Latran est requis dans cette régulation (images extraites de Makki et al., 2010).
- Représentation schématique du rôle de la voie JAK/STAT dans la GL:** en absence de parasitisme, la voie JAK/STAT activée dans la ZM empêche la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques de la ZM. 24H après parasitisme, la surexpression de Latran conduit à l'inactivation de la voie JAK/STAT dans la ZM, permettant la différenciation massive des progéniteurs hématopoïétiques en lamellocytes.

4) Le contrôle de la réponse au parasitisme

Plusieurs processus cellulaires et voies de signalisation ont été identifiés comme intervenant dans le contrôle de la réponse immunitaire au parasitisme.

a) Le métabolisme

Chez la drosophile comme chez les mammifères, la mise en place d'une réponse immunitaire a un coût énergétique important car les nutriments, normalement requis à divers processus développementaux, sont attribués préférentiellement au système immunitaire en cas de stress immun (Calder, 2013). Chez la drosophile, une infection bactérienne entraîne un délai de croissance ainsi que le déstockage des réserves énergétiques (DiAngelo et al., 2009). Ces effets sont dépendants de l'activation de la voie Toll/NFκB dans le corps gras, qui en plus d'induire l'expression de molécules anti-microbiennes inhibe la voie insuline, entraînant ainsi une ré-allocation des ressources énergétiques vers les cellules immunitaires. Comme pour les infections bactériennes, la réponse au parasitisme par des guêpes mobilise les ressources énergétiques de l'hôte infecté. Il a été montré récemment qu'après parasitisme une part importante des nutriments de l'hôte est utilisée pour permettre la différenciation des lamellocytes, au détriment des processus de croissance et de stockage (Bajgar et al., 2015). Ce changement métabolique est permis par la sécrétion par les cellules immunitaires en circulation d'une hormone, l'Adénosine (Ado), agissant comme un senseur énergétique. Le relargage dans l'hémolymph d'Ado a pour conséquence une augmentation du taux de glucose, qui n'est plus stocké et se trouve ainsi disponible pour les cellules immunitaires. Ce changement métabolique est crucial pour la réussite de la réponse immunitaire contre le parasitisme (Bajgar et al., 2015).

b) La voie JAK/STAT

Plusieurs voies de signalisation et acteurs moléculaires intervenant dans le contrôle de la réponse au parasitisme ont été identifiés, parmi lesquels la voie Janus Tyrosine Kinase / Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT). Après liaison du ligand sur son récepteur, Domeless (Dome), Dome phosphoryle la kinase JAK, ancrée à sa partie intracellulaire. Chez la drosophile, la kinase JAK impliquée est appelée Hopscotch (Hop). L'activation par phosphorylation de Hop

conduit à la phosphorylation puis la translocation nucléaire de Stat92E, facteur de transcription effecteur de la voie JAK/STAT (Myllymäki and Rämet, 2014).

La première évidence d'un rôle de la voie JAK/STAT dans la réponse au parasitisme a été découverte lors de l'étude d'un mutant gain-de-fonction de la kinase Hop, le mutant Hop^{TumL} (Luo et al., 1995). L'allèle *hop*^{TumL} conduit à une activation constitutive de la signalisation JAK/STAT. Dans les larves mutantes Hop^{TumL} une augmentation du nombre d'hémocytes en circulation est observée, ainsi que l'apparition d'un grand nombre de lamellocytes et la présence de masses mélanotiques résultant de l'encapsulation des tissus larvaires (Luo et al., 1995). Par la suite, Sorrentino et col. (2004) a montré que la capacité d'encapsulation des œufs de guêpes est fortement réduite dans plusieurs mutants perte-de-fonction de la voie JAK/STAT, établissant ainsi le rôle clé de cette voie dans la réponse au parasitisme (Sorrentino et al., 2004). Cependant ces études ont été réalisées à partir de mutants, et le type de cellules dans le(s)quel(s) la fonction JAK/STAT est requise n'est (ne sont) pas clairement identifié(s). Au niveau de la GL, la voie JAK/STAT est active dans la ZM en l'absence de parasitisme (Krzemień et al., 2007 ; **Figure 25**). Après parasitisme, l'inactivation rapide de la voie JAK/STAT dans la ZM est requise à la production massive de lamellocytes dans la GL (Makki et al., 2010). L'inactivation de la voie JAK/STAT est dépendante de Latran, un récepteur tronqué agissant comme dominant négatif capable de se dimériser avec Dome et ainsi inhiber la signalisation en aval du récepteur. 4H après parasitisme, le niveau d'expression de Latran est augmenté d'un facteur 2 tandis que celui de Dome est diminué de moitié. Le changement de stoechiométrie entre le récepteur actif et le récepteur dominant négatif contribuerait à l'inactivation de la voie dans la ZM, en parallèle de la réduction drastique de l'expression du ligand Upd3 (Makki et al., 2010).

Chez la drosophile, les ligands responsables du contrôle de l'activation de la voie JAK/STAT sont les protéines Unpaired (Upd). Il existe trois ligands Upd ; Upd1, 2 et 3 ; qui sont codés par des gènes dupliqués situés côte à côte sur le chromosome X (Hombría and Brown, 2002). Makki et col. (2010) ont montré que dans la GL, *upd3* est exprimé dans la ZM et le PSC en absence de parasitisme. 4H après parasitisme, on observe une diminution du niveau d'expression d'*upd3*, ce qui suggère que Upd3 est le ligand régulant l'activité de la voie JAK/STAT dans la GL (Makki et al., 2010).

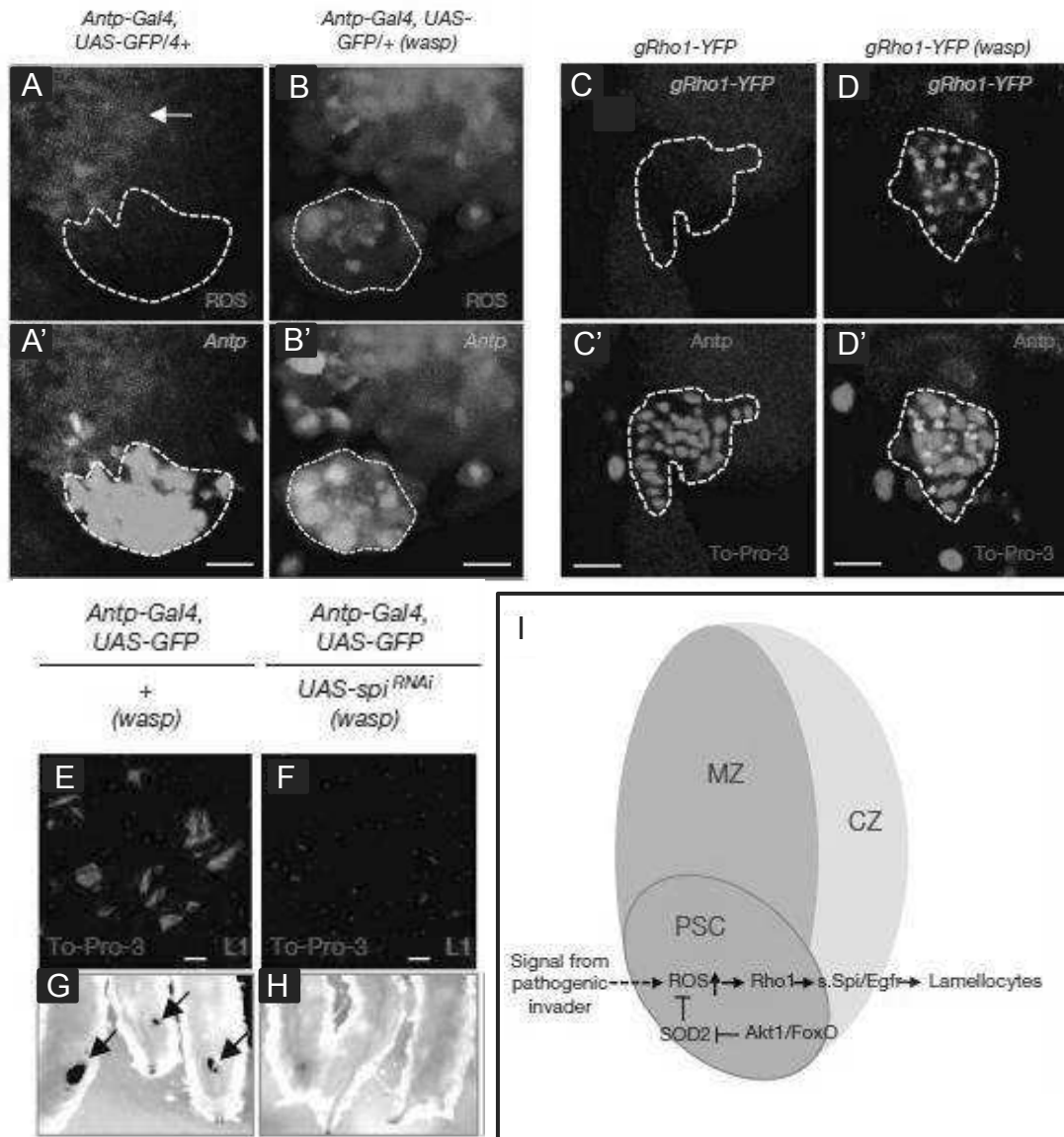


Figure 26 : Rôle des ROS et de la voie de signalisation EGFR dans la réponse au parasitisme par des guêpes

En absence de parasitisme, on ne détecte pas de ROS (rouge) dans le PSC marqué par Antp (vert), alors que des ROS sont présents dans la ZM (flèche) (A-A'). 12H après parasitisme par des guêpes, des ROS sont détectés dans le PSC (B-B').

Le rapporteur gRho1-YFP (vert) n'est pas exprimé dans la GL, en particulier dans le PSC (Antp, rouge), en absence de stress immunitaire (C-C'). gRho1-YFP est par contre exprimé dans le PSC 12 à 18H après parasitisme (D-D'). gRho1-YFP est un rapporteur de l'expression de la protéine Rho1, dont la fonction est de maturer par clivage le ligand Spi. L'expression de gRho1-YFP suggère donc que suite à un parasitisme le ligand Spi est clivé et activé dans le PSC. Il va diffuser et activer la voie EGFR dans les hémocytes en circulation.

Suite à un parasitisme, des lamellocytes (L1, rouge) sont détectés dans la circulation lymphatique de larves sauvages (E); et les œufs de parasites sont encapsulés (G : les flèches indiquent la présence d'œufs encapsulés). Lorsque l'expression de Spi est diminuée dans le PSC (Antp-Gal4,UAS-GFP;UAS-spi RNAi), aucun lamellocyte n'est détectée en circulation après parasitisme (F), et les œufs de guêpes ne sont pas encapsulés (H).

Le modèle proposé est que suite à un parasitisme par des guêpes, une production de ROS est induite dans le PSC. La présence de ROS active le clivage de Spi dans le PSC via la protéine Rho1. Spi clivé va diffuser dans l'hémolymphe et activer la voie EGFR dans les hémocytes en circulation, les poussant à se différencier en lamellocytes.

(d'après Sinenko et al., 2012)

De plus, une étude récente montre qu'un mutant nul *upd3* présente une capacité d'encapsulation accrue lors du parasitisme (Wang et al., 2014).

c) Les ROS et la voie EGFR

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie de la GL en absence d'infection. Un niveau plus important de ROS est en effet détectable dans la ZM, par opposition à la ZC et au PSC. Une augmentation du niveau de ROS dans la ZM entraîne la différenciation prématurée des progéniteurs hématopoïétiques en plasmacytes et cellules à cristaux (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). Le niveau de ROS joue également un rôle dans la réponse au parasitisme par des guêpes. 12H après parasitisme, le niveau de ROS présent dans le PSC augmente de façon importante, conduisant au clivage de Spi (Spi), l'un des ligands de la voie Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Il est proposé que Spi clivé diffuse et active la voie EGFR dans les hémocytes en circulation, ce qui entraîne leur différenciation en lamellocytes (**Figure 26** ; Sinenko et al., 2012).

d) La voie Notch

La voie de signalisation Notch (N) permet, chez la drosophile comme chez les vertébrés, la communication entre cellules par contact direct. En effet, le ligand de la voie, l'une des protéines transmembranaires Delta ou Serrate (Ser), interagit avec le récepteur N présent à la surface de la cellule adjacente. Cette interaction conduit à une cascade protéolytique aboutissant à la libération par clivage de la partie intracellulaire du récepteur N, appelée N^{icd}. Cette forme clivée et active de N interagit avec le facteur de transcription Suppressor of Hairless (Su(H)), qui peut alors activer la transcription de ces gènes cibles (Bray, 1998). Chez la drosophile, la voie N est impliquée dans l'hématopoïèse en conditions « normale » (sans infection). Elle est requise pour la formation des cellules à cristaux à la fois dans l'embryon et dans la larve (Duvic et al., 2002; Lanot et al., 2001). Dans la GL, la voie N joue un rôle plus complexe et intervient à différents niveaux. Le gène *ser*, codant pour l'un des ligands de la voie, est exprimé à la fois dans le PSC et dans quelques cellules dispersées

dans la GL (Lebestky et al., 2003). L'inhibition du récepteur N dans le PSC par interférence à l'ARN conduit à une réduction du nombre de cellules à cristaux, tandis qu'une augmentation de leur nombre est observée après surexpression dans le PSC de N^{icd} (Small et al., 2014), ce qui révèle un rôle non-cellulaire autonome de la voie N dans la production des cellules à cristaux par la GL. De plus, des clones mitotiques mutants pour N générés dans la GL ne contiennent jamais de cellules à cristaux, ce qui suggère que la voie N est aussi requise de façon cellulaire-autonome à la différenciation des cellules à cristaux de la GL (Lebestky et al., 2003).

La voie N intervient également en réponse au parasitisme par des guêpes. Suite au parasitisme, une réduction de l'activité N, visualisée grâce à un rapporteur d'expression du facteur de transcription Su(H), Su(H)-lacZ, est observée dans la GL (Small et al., 2014). Cette inhibition est requise à la différenciation des lamellocytes au dépend des cellules à cristaux. Enfin, une diminution de la voie N dans le PSC par ARN interférent semble conduire à une augmentation du niveau de ROS dans la GL, mais pas dans le PSC, révélant un lien possible entre les ROS et la voie N (Small et al., 2014). Cette dernière donnée reste néanmoins peu étayée et des analyses supplémentaires sont requises pour définir le rôle précis de la voie N dans la réponse au parasitisme, et ses liens avec les ROS.

e) La voie Toll/NFκB

De façon similaire au mutant *hop*^{TumL}, correspondant à une activation constitutive de la voie JAK/STAT, la présence ectopique de lamellocytes et de capsules mélanotiques en absence de stress immun est observée dans certains mutants de la voie Toll/NFκB : les mutants *toll*^{10B} et *cactus* (Qiu et al., 1998). Ces deux mutants correspondent à un gain-de-fonction de la voie Toll/NFκB (cf Figure 17 pour la présentation de la voie). La mutation *toll*^{10B} est une mutation ponctuelle dans le gène codant pour le récepteur Toll, qui est alors constitutivement activé, indépendamment de la présence de son ligand, tandis que le mutant *cactus* est déficient pour la protéine Cactus, inhibitrice de la voie (Qiu et al., 1998). Ces données suggèrent un rôle potentiel de l'activation de la voie Toll/NFκB dans la réponse au parasitisme. La fonction de la voie Toll/NFκB dans la réponse au parasitisme a été validée par l'analyse de mutants perte-de-fonction de plusieurs composants canoniques de la

voie (Sorrentino et al., 2004). Dans cette étude, les auteurs ont montré que le taux d'encapsulation des œufs de guêpe après parasitisme est fortement réduit dans des contextes mutants pour *snake* et *easter* (gènes codant pour les enzymes responsables de la maturation du ligand Spz), *spz*, *toll*, *tube* et *pelle*.

Plus récemment, Gueguen et al. ont montré que le transgène D4-lacZ, composé de 4 répétitions du site de fixation des facteurs NFκB Dif et Df en aval de la séquence codante de lacZ (Flores-Saaib et al., 2001), est exprimé dans le PSC en absence de stress immun (Gueguen et al., 2013). L'expression de D4-lacZ dans le PSC est augmentée d'un facteur 4 après parasitisme, et une expression *de novo* de ce transgène est observée dans le reste de la GL. Ces données suggèrent que la voie NFκB est activée de façon dynamique dans la GL, et plus particulièrement dans le PSC, en réponse au parasitisme. En absence de parasitisme, l'homéostasie de la GL est légèrement modifiée lorsque la protéine vAnkyrine I3, inhibitrice de la voie Toll/NFκB, est surexprimée dans le PSC, suggérant un rôle de la voie Toll/NFκB dans le maintien d'une homéostasie normale de l'organe hématopoïétique en absence de stress immun. Suite au parasitisme, la surexpression de la vAnkyrine I3 dans les hémocytes en circulation conduit à un défaut d'encapsulation des œufs de guêpes (Gueguen et al., 2013). Sur la base du profil d'expression du transgène D4-lacZ dans la GL et de l'effet de la surexpression des vAnkyrines dans les cellules immunitaires circulantes, les auteurs proposent que la voie de signalisation NFκB pourrait intervenir dans le PSC pour permettre la réponse au parasitisme. Néanmoins aucune expérience dans cette étude ne démontre un rôle de cette voie dans le PSC ou même dans la GL lors de la réponse au parasitisme. Au cours de ma thèse, j'ai cherché à comprendre comment la voie Toll/NFκB contrôle la réponse immunitaire au parasitisme, en me focalisant plus particulièrement sur son rôle dans la GL.

Résultats

Résultats

I. La voie Toll/NFκB via Dif contrôle la dispersion de la GL suite à un parasitisme par des guêpes

A) Résumé

La voie Toll/NFκB a été montrée comme essentielle à la réponse au parasitisme par des guêpes (cf introduction III-C-3e)). Néanmoins, son rôle au niveau de l'organe hématopoïétique n'a pas été clairement identifié. J'ai donc entrepris d'étudier la fonction de la voie Toll/NFκB dans la GL lors du parasitisme. J'ai pu montrer que la voie Toll/NFκB est activée de façon dynamique dans la GL suite au parasitisme. En absence de parasitisme, le facteur de transcription NFκB Dif est actif dans le PSC indépendamment de la voie Toll/NFκB canonique, et régule l'homéostasie de la GL. Après parasitisme, la voie Toll/NFκB est activée dans la GL ; d'une part dans le PSC, via le facteur de transcription Dif, et d'autre part dans la ZM, où les deux facteurs de transcription NFκB DI et Dif contribue à son activation. De plus, j'ai montré que l'activité de Dif ainsi que l'activation de la voie Toll/NFκB dans le PSC sont nécessaires après parasitisme à la dispersion de la GL, qui permet le relargage des lamellocytes dans la circulation lymphatique. Ce relargage pourrait être essentiel à l'encapsulation des œufs de guêpe et ainsi à la neutralisation de leur développement. Une étude précédente a établi qu'un haut niveau de ROS dans le PSC, conduisant à l'activation du ligand de la voie EGFR Spi, contribue au contrôle de l'encapsulation des œufs de guêpes suite au parasitisme (Sinenko et al., 2012). J'ai montré que cette même cascade moléculaire est requise à la dispersion de la GL après parasitisme. L'ensemble de ces données suggère une relation possible entre le niveau de ROS et l'activation des voies Toll/NFκB et EGFR lors de la réponse au parasitisme par des guêpes. Mes résultats établissent que l'activation de la voie Toll/NFκB dans le PSC est dépendante d'un haut niveau de ROS, tandis que les voies de signalisation Toll/NFκB et EGFR agissent en parallèle pour contrôler la dispersion de la GL après parasitisme. Mes travaux ont donc permis d'établir un nouveau réseau génétique dans la « niche hématopoïétique » de la drosophile impliqué dans la mise en place de la réponse immunitaire cellulaire au parasitisme par des guêpes. Ces observations faites chez la Drosophile posent la question de la

conservation de ce réseau chez les mammifères lors d'une infection par un organisme pathogène.

B) Article

Toll/NFκB dependent niche activation controls *Drosophila* immune response upon wasp parasitism

Isabelle Louradour, Ismaël Morin-Poulard, Anurag Sharma, Alain Vincent, Michèle Crozatier and Nathalie Vanzo**

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547 CNRS/Université Toulouse III and
Fédération de Recherche de Biologie de Toulouse, 118 route de Narbonne 31062
Toulouse cedex 9 France

*Authors for correspondence

(michele.crozatier-borde@univ-tlse3.fr ; nathalie.vanzo@univ-tlse3.fr)

Tel: 00 33 5 61 55 82 89; Fax: 00 33 5 61 55 65 07

Abstract

The cellular immune response relies on immune/blood cells produced during hematopoiesis. In mammals, a specialized microenvironment called the “hematopoietic niche” regulates the self-renewal and differentiation of the Hematopoietic Stem Cells (HSCs). However, the role of the hematopoietic niche in the control of the cellular immune response remains unclear. In *Drosophila*, the larval hematopoietic organ is the Lymph Gland (LG). Within the LG, the Posterior Signaling Center (PSC) plays a role equivalent to a niche, by regulating the balance between progenitors and differentiated blood cells. Upon wasp parasitism, the PSC controls the cellular immune response, but the mechanisms involved are largely unknown. Here we report that upon parasitism, the Toll/NFκB signaling pathway is activated through the NFκB transcription factor Dif in PSC cells, and that it is required for mounting the appropriate cellular immune response. Furthermore, we establish a regulatory network involving the Toll/NFκB and EGFR signaling pathways, together with increased ROS levels, to control the *Drosophila* immune response. Whether this network and the NFκB signaling pathway are conserved and required in mammals to respond to pathogenic infections, is an open question.

Introduction

The cellular immune response is required for fighting pathogenic invaders and relies on immune/blood cells produced during hematopoiesis. In adult mammals, hematopoiesis occurs in the bone marrow, where a specific microenvironment called the “hematopoietic niche” controls self-renewal, proliferation and differentiation of the Hematopoietic Stem Cells (HSCs), giving rise to all blood cell types (Al-Drees et al., 2015; Schofield, 1978). However, how pathogenic infections modulate hematopoiesis is largely unknown.

Over the past decades, *Drosophila* has become a powerful genetic model to study *in vivo* hematopoiesis and the innate immune response, based on the high conservation of genes and molecular cascades during evolution. *Drosophila* hematopoiesis occurs at the larval stage in a specialized organ called the Lymph

Gland (LG), composed of two primary lobes and several pairs of secondary lobes aligned along the cardiac tube, the vascular system of *Drosophila* (Jung et al., 2005; Lanot et al., 2001). Each primary lobe presents a stereotypical organization in three zones: the medial part, termed the Medullary Zone (MZ), contains the hematopoietic progenitors or prohemocytes; the external part, termed the Cortical Zone (CZ), is composed of differentiated immune/blood cells, called hemocytes in insects; and a small group of cells localized at the posterior tip of the lobe and termed the Posterior Signaling Center (PSC), regulates LG homeostasis (Jung et al., 2005; Krzemien et al., 2010; Krzemień et al., 2007; Mandal et al., 2007). It has been proposed that the PSC acts as a “hematopoietic niche”, as it regulates the balance between prohemocytes and differentiated cells (Benmimoun et al., 2012; Dragojlovic-Munther and Martinez-Agosto, 2012; Krzemień et al., 2007; Lam et al., 2014; Mandal et al., 2007; Mondal et al., 2011; Mondal et al., 2014). In the absence of an immune challenge, two types of immune/blood cells are produced in the LG: plasmatocytes, corresponding to macrophages in mammals, and crystal cells, related to platelets and involved in the melanisation process, an insect specific immune defense. In response to immune challenges, in particular upon wasp parasitism, LG homeostasis is drastically modified (Krzemień et al., 2007). Parasitoid wasps such as *Leptopilina boulardi* lay their eggs inside *Drosophila* larvae, leading to the massive differentiation of the MZ hematopoietic progenitors into a third immune cell type called lamellocytes. The LG then disperses prematurely and lamellocytes are released into the hemolymph (Lanot et al., 2001). Lamellocytes are big flattened cells involved in the encapsulation of objects too large to be phagocytosed, such as wasp eggs. The wasp egg encapsulation results in its neutralization and thus allows *Drosophila* to fight this infection (Keebaugh and Schlenke, 2014; Márkus et al., 2005; Rizki and Rizki, 1992; Sorrentino et al., 2002).

The PSC plays a critical role in mounting the cellular immune response against wasp parasitism. Indeed, in the absence of PSC cells, as observed in the *col1* null mutant, or when the *reaper* pro-apoptotic gene is expressed in the PSC, no lamellocytes are produced inside the LG upon wasp parasitism (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007). Recently, Sinenko et al. established that 12 hours following wasp parasitism, the level of Reactive Oxygen Species (ROS) is strongly increased in PSC cells, and that high ROS levels in those cells are required for wasp

egg encapsulation (Sinenko et al., 2012). The authors propose that upon parasitism, the increase of ROS levels in PSC cells leads to the activation by cleavage of Spitz (Spi), one ligand of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) pathway. Cleaved Spi secreted from PSC cells might activate the EGFR pathway in circulating hemocytes, pushing them to differentiate into lamellocytes (Sinenko et al., 2012). The Toll/NFκB signaling pathway is also involved in the immune response to parasitism. No wasp egg encapsulation is observed upon parasitism in null mutants for different components of the Toll/NFκB pathway (Sorrentino et al., 2004), whereas an ectopic lamellocyte production and the presence of melanotic capsules in the absence of immune challenge, are observed when the Toll/NFκB pathway is constitutively activated, such as in the *toll*^{10B} mutant (Qiu et al., 1998). In *Drosophila*, the Toll/NFκB pathway is activated by the binding of its ligand Spätzle on the receptor Toll, leading to a phosphorylation cascade involving the Pelle (Pll) kinase. This phosphorylation cascade ends up in the phosphorylation of Cactus, the *Drosophila* homologue of “Inhibitor of NFκB” (IκB). Phosphorylated Cactus is degraded by the proteasome, leading to the release of the NFκB transcription factors, Dorsal (Dl) and Dorsal-related immunity factor (Dif), which translocate into the nucleus and activate transcription of their target genes (Hetru and Hoffmann, 2009; Lemaitre and Hoffmann, 2007). The Toll/NFκB signaling pathway is evolutionarily conserved and plays a key role in the humoral immune response both in *Drosophila* and mammals (Hayden and Ghosh, 2011; Hetru and Hoffmann, 2009; Lemaitre and Hoffmann, 2007); however its role in the cellular immune response remains unclear.

Here, we investigate the role of the Toll/NFκB signaling pathway in the LG upon wasp parasitism. We report that upon wasp parasitism, the Toll/NFκB pathway is activated in PSC cells, through the NFκB transcription factor Dif, and is required for LG dispersion and lamellocyte release in the hemolymph. This is followed by wasp egg encapsulation and successful parasitism fighting. Upon parasitism, Toll/NFκB pathway activation in PSC cells is dependent on high ROS levels. Our data further establish that the EGFR pathway is also required in LG hematopoietic progenitors to control the organ dispersion upon parasitism. Altogether, our data show that Toll/NFκB and EGFR pathways act in parallel to control the *Drosophila* cellular immune response upon wasp parasitism.

Results

Upon parasitism the Toll/NFκB signaling pathway controls LG dispersion via Dif

Several components of the Toll/NFκB signaling pathway, including the Pelle (Pll) kinase, are known to be required for wasp egg encapsulation upon parasitism (Sorrentino et al., 2004). To better understand how this signaling pathway is involved in fighting wasp parasitism, we analyzed LG behavior in different Toll/NFκB pathway mutants. In wt, a massive differentiation of lamellocytes is observed in LGs 20H post wasp parasitism. Dispersion of LG primary lobes occurs and leads to lamellocyte release into the hemolymph. 30H post parasitism, the LG dispersion is complete (Fig1A). In a *pll* mutant (*pll2/pll7* transheterozygous), 100% of LGs remain intact 30H post parasitism (Fig1B). This indicates that the Toll/NFκB pathway is required for LG dispersion upon parasitism. Analyzing in detail the LG dispersion phenotype allows us to classify the LGs into three classes: dispersed (see Fig1A); dispersing, corresponding to LGs where some signs of dispersion are seen at the cortex but the LG primary lobes are still present (see Fig3A); and intact, where no sign of dispersion is observed (see Fig1B). Interestingly, a defect in LG dispersion is also observed in a *dif* null mutant (*dif1*; Fig1D), whereas LGs are dispersed in a *dorsal* (*dl*) null mutant as in wt (*dl1*; Fig1C). This indicates that Dif, and not DI, is the NFκB transcription factor required downstream of the Toll/NFκB pathway for LG dispersion upon wasp parasitism. This is confirmed by analyzing LG dispersion in transheterozygous mutant contexts using the J4 deficiency that removes both *dif* and *dl* genes (sup. Fig1). Compared to wt larvae, +/J4 larvae present a moderate LG dispersion phenotype upon parasitism (20% of the LGs are dispersed, 65% dispersing and 15% intact, compared to 73% dispersed, 24% dispersing and 2% intact in controls). This suggests that Dif and/or DI is(are) crucial for LG dispersion, and that removing one copy of those gene(s) leads to a slight LG dispersion defect. *dl1*/J4 mutant larvae have a phenotype equivalent to +/J4, indicating that the absence of DI doesn't increase the phenotype. In contrast, LG dispersion defects are strongly enhanced in *dif1*/J4 mutant larvae, where *dif* is missing (0% of the LGs are dispersed, 60% dispersing and 40% intact). Altogether, these data confirm that Dif plays a crucial role in LG dispersion upon wasp parasitism.

The LG disperses following massive LG lamellocyte differentiation. Thus, we wondered whether Dif and the Toll/NFκB pathway were required for massive LG lamellocyte differentiation. To identify lamellocytes, α-PS4 labelling was performed (Krzemień et al., 2007). Whereas lamellocytes are present in control LGs 20H post parasitism (Fig1F), no lamellocytes are detected in *dif1* mutant LGs (Fig1G). 30H post parasitism, whereas control LGs are dispersed, in *dif1* and *pll2/pll7* mutants the LGs remain intact and contain few lamellocytes at the cortex (Fig1H-I). Altogether, these data indicate that both Toll/NFκB pathway activation and Dif are not required for lamellocyte differentiation *per se* but are required for massive lamellocyte differentiation and for LG dispersion upon wasp parasitism.

Dynamic activation of the Toll/NFκB pathway in the LG upon wasp parasitism

We looked at LG expression patterns of Dif, DI and the D4-lacZ transgene, a Toll/NFκB reporter that is composed of four Dif/DI binding sites upstream of the lacZ coding sequence (Flores-Saaib et al., 2001). As previously shown (Gueguen et al., 2013), the D4-lacZ transgene is expressed in PSC cells in the absence of parasitism, whereas 6H post parasitism its expression is increased in PSC cells, and *de novo* expression is detected in MZ cells (Fig2E-G). Dif has a similar expression pattern, as it is expressed in PSC cells in the absence of parasitism and both in PSC and MZ cells 6H post parasitism (Fig2A-B). In the absence of parasitism, DI is not expressed in PSC cells, whereas cytoplasmic DI is observed in MZ cells (Fig2C). 6H post parasitism, while DI is mainly located in the nucleus of MZ cells, it is not expressed in PSC cells (Fig2D). To define the respective contribution of Dif and DI in controlling D4-lacZ expression, we established its expression pattern in both *dif1* and *d11* mutants, without and 6H post parasitism. In both conditions, D4-lacZ expression is lost in PSC cells in *dif1* mutant (Fig2H-I), whereas it is not affected in *d11* mutant (sup. Fig2). Thus, in PSC cells Dif, and not DI, controls D4-lacZ expression. We looked at D4-lacZ expression in *pll2/pll7* mutant, where Toll/NFκB activation. Surprisingly without parasitism D4-lacZ expression in PSC cells is not affected in *pll2/pll7* nul mutant (Fig2J), indicating that in these cells, Dif controls D4-lacZ expression independently from Toll/NFκB pathway activation. 6H post parasitism, in *pll2/pll7* mutant D4-lacZ expression in PSC cells is not modified, whereas it is barely

detectable in MZ cells (Fig2K-L). These data indicate that in the absence of parasitism, D4-lacZ expression in PSC cells is dependent on Dif but independent of Toll/NFκB pathway activation, whereas in contrast upon parasitism, D4-lacZ upregulation in PSC cells and its *de novo* expression in MZ cells is controlled by Toll/NFκB pathway activation. Altogether these data establish that upon parasitism the Toll/NFκB pathway is activated in PSC and MZ cells.

Upon wasp parasitism Toll/NFκB activation in PSC cells controls LG dispersion

As the Toll/NFκB pathway is activated in PSC cells upon parasitism, we investigated its role in these cells. We decreased *pII* or *dif* in PSC cells by expressing RNAi, using the PSC-specific *col* driver, and analyzed LG dispersion 30H post parasitism. In both cases (*col>pII* KD and *col>dif* KD), 20% and 36% of LGs were dispersed, compared to 80-85% in control LGs (Fig3A-C). These data establish that Dif and the activation of the Toll/NFκB pathway are both required in PSC cells to control LG dispersion upon parasitism. As Dif is expressed in PSC cells both in the presence and absence of parasitism, we were interested in finding out when the function of Dif is required in these cells upon parasitism. We used the Gal4/Gal80ts system (McGuire et al., 2003). At 27°C, the Gal80ts repressor is inactive, whereas at 18°C it is active and represses Gal4 activity. When Dif expression is decreased and the Toll/ NFκB pathway is inactivated in PSC cells post parasitism (*tubgal80^{ts}; antp>cactus>dif* KD; designated as ON-OFF), 30% of LGs are dispersed, compared to 80% in controls (Fig3D-F). In contrast, decreasing Dif and inactivating the Toll/NFκB pathway in PSC cells during development and restoring their activities 6H before wasp parasitism (*tubgal80^{ts}; antp>cactus>dif* KD; designated as OFF-ON), leads to a percentage of LG dispersion (75%) similar to control (81%) (Fig3E-F). This indicates that Dif and Toll/NFκB pathway activation in PSC cells are required during and post parasitism for LG dispersion. Inhibiting post parasitism Spätzle (Spz), the ligand of the Toll/NFκB pathway, leads to a LG dispersion defect (0% of LGs are dispersed 30H post parasitism, compared to 88% of the control LGs) (Fig3G-H). In addition, in *dif1* mutant or when Dif is decreased in PSC cells in absence of parasitism, both a decreased expression of the DomeMESO-GFP MZ marker and a reduced number of crystal cells are observed (sup. Fig3). A slight increase in PSC

cell number compared to controls is also observed. This indicates that under physiological conditions Dif in PSC cells controls LG homeostasis and PSC cell number. Altogether, these data demonstrate that Toll-independent Dif activity in PSC cells in the absence of parasitism is involved in the maintenance of LG homeostasis, whereas upon parasitism Dif expression and Toll/NFκB pathway activation in these cells are required for LG dispersion.

Toll/NFκB pathway activation in PSC cells upon parasitism is under the control of ROS levels

Previous studies established that PSC cells play a key role in controlling LG lamellocyte differentiation upon wasp parasitism (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007). A recent study further demonstrated that wasp parasitism leads to increased ROS levels in PSC cells, and that decreasing ROS levels in those cells leads to a defect in wasp egg encapsulation (Sinenko et al., 2012). Based on these data, we investigated whether a functional link exists between ROS levels and Toll/NFκB pathway activation in PSC cells upon parasitism. First we determined whether the increase in ROS levels in PSC cells 6H post parasitism is dependent on Toll/NFκB activation. We analyzed the expression of the GstD-lacZ transgene, a reporter for ROS production (Sykiotis and Bohmann, 2008). In control LGs without parasitism, GstD-lacZ is expressed at low levels in all LG cells (Fig4A). 6H post parasitism, GstD-lacZ is highly expressed in all LG cells, including PSC cells (Fig4B-E-F). Interestingly, GstD-lacZ is not only increased in PSC cells but also in all other LG cells, suggesting that wasp parasitism induces an increase in ROS production not only in PSC but in all LG cells. Decreasing ROS levels in PSC cells 6H post parasitism by expressing Catalase (*col>catalase*) leads to a strong decrease in GstD-lacZ expression in PSC cells (Fig4C-E). Interestingly, GstD-lacZ expression is also decreased in other LG cells, revealing a cross regulation between PSC and MZ cells for controlling ROS levels (Fig4C-F). Decreasing Dif and inactivating Toll/NFκB signaling in PSC cells (*col>cactus>dif* KD) 6H post parasitism doesn't affect GstD-lacZ expression in PSC cells, suggesting that in these cells the increase in ROS levels is independent of Toll/NFκB activation (Fig4D-E). Decreasing ROS levels in PSC cells (*col>catalase*) leads to a defect in LG dispersion 30H post parasitism

(Fig4G-J), indicating that increasing PSC ROS levels is required for LG dispersion. To functionally link ROS levels and PSC Toll/NFκB activation in the control of LG dispersion, we performed rescue experiments. The expression of UAS-Toll10B transgene, which encodes a constitutively active form of the Toll receptor (Qiu et al., 1998), results in constitutive activation of the Toll/NFκB pathway. Without parasitism, differentiated lamellocytes are detected in the CZ of *col>Toll10B* LGs, and the LGs remain intact (sup Fig4). 30H post parasitism, *col>Toll10B* LGs are dispersed as in controls (Fig4H; not quantified). The LG dispersion defect observed when ROS levels are decreased in PSC cells, is partially rescued by the constitutive activation of Toll/NFκB pathway in these cells (*col>catalase>Toll^{10B}*; Fig4I-J). Altogether, these data indicate that Toll/NFκB pathway activation in PSC cells upon parasitism is dependent on increased ROS levels.

Toll/NFκB and EGFR signaling pathways act independently to control the LG dispersion upon parasitism

In a previous study, Sinenko et al. established that the EGFR signaling pathway is required for wasp encapsulation. The authors proposed that in response to wasp parasitism, ROS produced by PSC cells lead to the cleavage of Spitz (Spi), one ligand of the EGFR signaling pathway. Cleaved Spitz (cSpi) secreted from PSC cells activates the EGFR pathway in hemolymph, circulating hemocytes, pushing them to differentiate into lamellocytes (Sinenko et al., 2012). We investigated the role of the EGFR pathway in the LG in response to wasp parasitism. Decreasing the production of the Spi ligand in the PSC (*antp>spi* KD), leads to 45% of LGs dispersion upon parasitism, compared to 86% in control (Fig5A-C). Inhibiting the EGFR pathway in MZ cells by expressing a dominant negative form of the EGFR receptor (*dome>DER* DN), results in 25% of LGs dispersed, compared to 96% in controls (Fig5B-C). These data suggest that upon parasitism the EGFR pathway, activated by Spi produced by PSC cells, is required in MZ cells for LG dispersion. To follow the EGFR activity we looked at the expression of p-ERK. Without parasitism, p-ERK is not detected in LG cells (Fig5D). 6H post parasitism, p-ERK is observed in MZ but not in PSC cells (Fig5E). This suggests that without parasitism the EGFR pathway is inactive, whereas it is activated in MZ cells upon wasp parasitism. As Toll/NFκB and the

EGFR pathways are both required for LG dispersion post parasitism, we asked whether there is any crosstalk between them. One hypothesis is that Toll/NFκB activation in PSC cells might control Spi activation upon parasitism. We performed rescue experiments by simultaneously expressing in PSC cells a secreted form of Spi and Cactus that leads to Toll/NFκB pathway inhibition (*antp>cactus>cSpi*). 30H post parasitism 20% of LGs are dispersed in this condition, which is similar to when the Toll/NFκB pathway alone is inhibited (25%) (Fig5G-H). Without parasitism, cSpi overexpression in PSC cells (*co/>cSpi*) leads to the differentiation of a few lamellocytes in the LG, and LG primary lobes remain intact (sup. Fig4), whereas 30H post parasitism the LGs disperse as in controls (Fig5-F; not quantified). Altogether, these data establish that cSpi expression in PSC cells cannot rescue the Toll/NFκB mutant LG dispersion defect, suggesting that Toll/NFκB and EGFR pathways act in parallel to control LG dispersion upon parasitism.

In conclusion, these data demonstrate the key role of Dif and Toll/NFκB pathway activation in PSC cells upon wasp parasitism, and they establish the existence of a genetic network involved in the control of LG dispersion (Fig6). Without parasitism, Dif is expressed in PSC cells and acts independently of the Toll/NFκB pathway to control the number of PSC cells and LG homeostasis (Fig6A). 6H post wasp parasitism, ROS levels are increased in PSC cells and induce both Toll/NFκB activation and the production of cSpi in PSC cells. cSpi in turn activates the EGFR pathway in MZ cells (Fig6B). Together, high ROS levels and the activation of the Toll/NFκB and EGFR pathways in PSC and MZ cells, respectively, are required for LG dispersion upon parasitism. This leads to a massive release of lamellocytes in the hemolymph, a crucial step for drosophila to mount an efficient immune response against wasp parasitism.

Discussion

In this study, we establish that upon parasitism the Toll/NFκB pathway, through Dif, is activated in PSC cells and is required for LG dispersion, which is a key step for wasp egg encapsulation and a successful fight against wasp parasitism. We further establish that a PSC regulatory network is controlling LG dispersion upon wasp parasitism. Parasitism induces an increase in ROS levels in PSC cells, which

leads to the activation of the Toll/NFκB and EGFR signaling pathways in PSC and MZ cells, respectively, both acting independently to control LG dispersion.

Upon parasitism, the release of lamellocytes from LGs represents a crucial event for *Drosophila* in its fight against wasp parasitism, even though the molecular processes involved in LG dispersion upon parasitism remain unknown. One hypothesis is that the massive differentiation of lamellocytes, which are large flat cells, in the LG creates a mechanical tension, resulting in LG cell dispersion. According to this idea, a reduced or delayed production of lamellocytes in LGs, as observed in *pII* or *dif* mutants, might result in a LG dispersion defect and thus immune response deficient larvae. Thus, deciphering the molecular processes controlling LG dispersion upon parasitism represents an important question. This study confirms previous analyses, establishing that the PSC is a key player in the cellular immune response upon wasp parasitism (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007; Sinenko et al., 2012). Decreasing *pII* or *dif* expression by RNAi treatment in PSC cells, leads to a milder LG dispersion defect compared to null mutant larvae. This might be due to either hypomorphic conditions resulting from RNAi treatments, or a requirement for Dif and the Toll/NFκB pathway in other LG cells besides PSC cells. In agreement with this proposal, we observed that 6H post-parasitism the D4-lacZ transgene is expressed in MZ cells, and this might reflect *de novo* Toll/NFκB pathway activation in these cells. Additional investigation is needed to determine whether Toll/NFκB activation in MZ cells has any role to play in the immune response.

Constitutive activation of the Toll/NFκB pathway in PSC cells (*col>Toll^{10B}*), or the expression of a cleaved form of Spi in PSC cells (*col>cSpi*), leads to lamellocyte differentiation at the cortex of the LG in absence of wasp parasitism, but it doesn't lead to LG dispersion. This indicates that the activation of the Toll/NFκB pathway, or the production of cSpi in PSC cells, does not reproduce the LG phenotype observed upon parasitism. Thus, additional regulation, which remains to be elucidated, is involved in controlling LG dispersion. A previous study established that JAK/STAT signaling has to be switched off in MZ cells for an efficient response to wasp parasitism (Makki et al., 2010). The potential crosstalk between the JAK/STAT, the EGFR and the Toll/NFκB signaling pathways remains to be addressed.

A previous study reported that upon wasp parasitism an increase in ROS levels is observed in PSC cells, leading to the production of cSpi that is secreted in the hemolymph and activates the EGFR pathway in circulating hemocytes, inducing their differentiation into lamellocytes (Sinenko et al., 2012). Our study further establishes that in the LG the EGFR pathway has to be activated in MZ cells for LG dispersion, and that cSpi from the PSC might be involved. Upon parasitism, high ROS levels in PSC cells activate both the EGFR and the Toll/NFκB pathways in MZ and PSC cells, respectively. Epistasis experiments establish that these two signaling pathways act independently to control LG dispersion upon wasp parasitism. The initial step required for LG dispersion is the increase in ROS levels in PSC cells. Very interestingly, we observe that 6H post parasitism there is also an increase in ROS levels in MZ cells, that is dependent on ROS levels in PSC cells. The role of the increased ROS levels in MZ cells, and how ROS levels from the PSC affect the amount of ROS in MZ cells, remain to be deciphered.

Many studies performed in mammals have revealed complex crosstalk between ROS and NFκB signaling (Morgan et al., 2011). Recently, in breast cancer cells it has been shown that an acidic microenvironment promotes tumor invasiveness by inducing the generation of ROS, which in turn leads to NFκB signaling activation (Gupta et al., 2014). In PSC cells, how at the molecular level, high ROS levels could lead to Toll/NFκB pathway activation and what are the possible downstream target genes, remain open questions. Interestingly, a ROS-dependent activation of the Toll/NFκB pathway has also been reported in *Aedes aegypti* mosquitos upon bacterial infection. Furthermore, a *Wolbachia* bacteria infection has been shown to confers to mosquitos a resistance to pathogens, including the Dengue virus (Bian et al., 2010). Pan et al. show that this resistance is mediated by the activation of the Toll/NFκB signaling pathway, which is dependent on increased ROS levels (Pan et al., 2012). Altogether, these data pose the question of whether a ROS-dependent activation of the Toll/NFκB pathway might be an evolutionarily conserved process to fight infections. Based on the high conservation of signaling pathways and processes controlling hematopoiesis between drosophila and mammals, our novel data raise the exciting issue of whether the regulatory network established in drosophila might also be involved in the mammalian hematopoietic niche upon immune stimulation.

Materials and methods

Drosophila strains: the following *Drosophila* lines were used: *w*¹¹⁸ (wt), *col-gal4* (Krzemień et al., 2007), *dome-gal4* (Krzemień et al., 2007), UAS-MCD8-GFP (Krzemień et al., 2007), *antp-gal4* (Mandal et al., 2007), Df(2L)J4 (Meng et al., 1999), GstD-lacZ (Wang et al., 2003), UAS-cSpi (Sudarsan et al., 2002), UAS-DER DN (Saxena et al., 2014), D4-lacZ on the third chromosome (Flores-Saaib et al., 2001). We constructed a D4-lacZ line on the second chromosome by injecting a plasmid containing the D4-lacZ sequence (HPWβD plasmid, (Flores-Saaib et al., 2001). The UAS-Cactus line was a gift from S. Govind (The Graduate School and University Center of The City University of New York, New York, USA). We constructed the DomeMESO-GFP transgenic line by cloning the DomeMESO sequence (Rivas et al., 2008) upstream of the coding sequence of an unstable form of GFP (EGFP-Nintra; (Neuburger et al., 2006). The other *Drosophila* lines were provided by the Bloomington (BL) or Vienna *Drosophila* RNAi (VDRC) stock centers. The following stocks were used: *p112* (*p1178*; BL3111), *p117* (*p11385*; BL3112), *dif1* (BL36559), *dl1* (BL3236), UAS-*p11*/RNAi (BL34733 and BL3577), UAS-*dif*/RNAi (BL30513), *tubgal80ts* (BL7019), *spzts* (called *spz*^{RM7} or *spz4*; BL55718), UAS-*catalase* (BL24621), UAS-*Toll*^{10B} (BL58987), UAS-*spi* RNAi (VDRC3922). For all RNAi treatments, UAS-Dicer2 was introduced (BL24650).

Antibody staining: staining procedures were performed as described previously (Krzemień et al., 2010; Pennetier et al., 2012), using rabbit anti-α-PS4 (1/200, (Krzemień et al., 2007), mouse anti-Col (1/100, (Krzemień et al., 2007), rabbit anti-Dif (1/500, gift from D. Ferrandon, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC), Université de Strasbourg, Strasbourg, France), mouse anti-DI (1/100, Hybridoma Bank), chicken anti-βgal (1/1000, Abcam), mouse anti-ProPO (1/200, T. Trenczel, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany), mouse anti-diphosphorylated Erk kinase (pERK) antibody (1/100, Sigma-Aldrich). Nuclei were labeled with Topro3 (Thermo Fisher Scientific), Dapi (sample mounted in Vectashield with Dapi, Vector Laboratories), or Draq5 (Thermo Fisher Scientific). Images were captured using a Zeiss710 or a Leica SP8 confocal microscope.

Wasp parasitism and LG dispersion assays: the G486 avirulent strain of the wasp *Leptopilina boulardi* was used to parasitize *Drosophila* late second instar larvae. Most of the parasitism experiments were performed at 27°C. *Drosophila* laid eggs for 12H; then at the L2 stage, larvae (48H after egg-laying: AEL) were subjected to wasp parasitism for 1H. Larvae were subsequently dissected at 6, 20 or 30H post parasitism. For the ON-OFF thermosensitive conditions, *Drosophila* egg-laying was performed at 22°C for 12H; then the larvae were allowed to develop at 18°C for 4 days (L2 stage). L2 larvae were shifted to 27°C and were parasitized for 1H, 6H after the temperature shift. To test for LG dispersion, dissection was performed 30H post parasitism. For the OFF-ON conditions, *Drosophila* egg-laying was performed at 27°C for 12H. 48H AEL larvae were shifted to 22°C. Wasp parasitism was performed 6H later, and LG dissection was performed 42-44H post parasitism. For LG dispersion quantifications, LGs were classified into 3 groups: dispersed, dispersing and intact. Each experiment was repeated at least 3 times, and quantifications represent the mean of several experiments. The number of analyzed LGs is indicated in the figures.

Quantification of expression intensity: for D4-lacZ and GstD-lacZ expression intensity in PSC cells, Fiji software was used to define the ROIs (Regions Of Interest) corresponding to PSC cells, labelled by Col. The mean intensity by pixel in each ROI was quantified. For GstD-lacZ and DomeMESO-GFP expression intensity in the MZ, a homogenous part of the MZ was defined as a ROI in each LG primary lobe, and the mean intensity by pixel was quantified by the Fiji software. For each experiment the central focal plane of a Z stack was analyzed. Graphs and statistical analyses (t test with Welch's correction) were performed using GraphPad Prism 5 software.

Measuring crystal cell index and PSC cell number: for crystal cell indexes, LGs were stained with ProPO antibody and Topro3 or Dapi (nuclei). Optimized confocal sections were performed on a Zeiss 710 for 3D reconstruction. The number of crystal cells and the volume of each primary lobe (in μm^3) were measured using Volocity 3D

Image Analysis software (PerkinElmer). Crystal cell index corresponds to the number of crystal cells / (primary lobe volume/1000). The number of PSC cells was counted manually with the Zen software. Graphs and statistical analyses (t test with Welch's correction) were performed using GraphPad Prism 5 software. In all experiments, all genotypes were analyzed in parallel and each quantification corresponds to one experiment. Each experiment was repeated independently at least 3 times.

Figures

Figure 1: Dif and the Toll/NFκB signaling pathway control LG dispersion upon wasp parasitism

30H post wasp parasitism, LG primary lobes are dispersed in controls (A) or in the *dl1* null mutant (C), whereas they are intact in *pll2/pll7* (B) and *dif1* null mutants (D). Quantification of the percentage of LG dispersion is given in (E). 20H post parasitism, wt LGs contain lamellocytes (αPS4, green) (F), whereas *dif1* mutant LGs are devoid of lamellocytes (G). 30H post parasitism, some lamellocytes are detected in *dif1* (H) and in *pll2/pll7* mutant LGs (I). Nuclei are labelled with Topro3. The scale bar represents 20μm. The number of analyzed LGs (n) is indicated in the graphs. Quantifications correspond to 1 experiment for the *pll2/pll7* mutant, and to the mean of 4 independent experiments for *dl1* and *dif1* null mutants.

Figure 2: Dynamic Dif expression and Toll/NFκB signaling pathway activation in the LG upon wasp parasitism

Dif (red) is expressed in PSC cells (*col>GFP*, green) in the absence of parasitism (A-A''), whereas it is expressed in both PSC and the MZ cells 6H post parasitism (B-B''). DI (red) is expressed in the cytoplasm of MZ cells in the absence of parasitism (C) and accumulates in the nucleus in response to wasp parasitism (D). Dorsal is never detected in PSC cells (*col>GFP*, green) (C'-C'' and D'-D''). The D4-lacZ reporter gene (red) is expressed in PSC cells (*Col*, green) in the absence of parasitism (E-E''). 6H post wasp parasitism, D4-lacZ expression is upregulated in PSC cells, and it is *de novo* expressed in MZ cells (F-F''). Quantifications of D4-lacZ expression in PSC cells are given in (G). In *dif1* mutant LGs, D4-lacZ expression is lost in PSC cells (*Col*, green), both without parasitism (H-H'') and 6H post parasitism (I-I''), indicating that Dif is responsible for D4-lacZ PSC expression. In *pll2/pll7* null mutant, D4-lacZ is detected in PSC cells in the absence of parasitism (J-J''), indicating that D4-lacZ expression in the absence of parasitism is independent of Toll/NFκB signaling pathway activation. Upon wasp parasitism, D4-lacZ expression is not modified in *pll2/pll7* mutant LGs compared to unparasitized *pll2/pll7* LGs, suggesting that D4-lacZ expression changes observed post parasitism are dependent on Toll/NFκB signaling

pathway activation (K-K''); quantification in L). Nuclei are labeled with Topro3 or Draq5. The scale bar represents 20µm.

Figure 3: Dif expression and Toll/NFκB activation in PSC cells control LG dispersion upon parasitism

Downregulating the Toll/NFκB pathway (*col>pIIKD*, A) or decreasing Dif (*col>dif KD*, B) in PSC cells impairs LG dispersion 30H post parasitism. Quantifications of LG dispersion are given in (C). Decreasing Dif in PSC cells only after parasitism (*tubgal80^{ts}; antp>Cactus>dif KD*; designated as ON-OFF, D) leads to a LG dispersion defect, whereas the percentage of LG dispersion is similar to control when Dif is decreased before parasitism and restored upon parasitism (*tubgal80^{ts}; antp>Cactus>dif KD*; designated as OFF-ON, E). Quantifications are given in (F). Inactivating the Toll/NFκB pathway only upon parasitism by removing the ligand Spz (*spz ts* mutant) leads to a LG dispersion defect (G). Quantifications are given in (H). The scale bar corresponds to 20µm. The number of analyzed LGs (n) is indicated; quantifications correspond to the mean of 2, 4, 2, 2 and 1 independent experiments for *col>pIIKD*; *col>dif KD*; *tubgal80^{ts}; antp>Cactus>dif KD* ON-OFF and OFF-ON, and *spz ts*, respectively.

Figure 4: High ROS levels in PSC cells control Toll/NFκB activation in PSC cells upon wasp parasitism

Without parasitism, GstD-lacZ (red) is weakly expressed in LGs (A-A''). 6H post parasitism, GstD-lacZ is strongly upregulated, both in PSC (Col, green) and MZ cells (B-B''). Quantifications are given in (E) for PSC cells and in (F) for MZ cells. GstD-lacZ expression is reduced in all LG cells 6H post parasitism when ROS levels are decreased in PSC cells (*col>catalase*, C-C''). Decreasing Dif and inactivating the Toll/NFκB pathway in PSC cells (*col>cactus>dif KD*) 6H post parasitism does not affect GstD-lacZ expression (D-D''). Quantifications of GstD-lacZ expression levels in PSC and MZ cells are given in (E) and (F), respectively. Decreasing ROS levels in PSC cells impairs LG dispersion upon wasp parasitism (*col>catalase*, G). 30H post parasitism, LGs are dispersed when the Toll/NFκB pathway is constitutively activated

in PSC cells (*col>Toll10B*, not quantified, H). The LG dispersion defect observed when ROS levels are decreased in PSC cells is partially rescued by a constitutive activation of the Toll/NFκB pathway in PSC cells (*col>catalase>Toll10B*, I). Quantifications of LG dispersion are given in (J). Nuclei are labelled with DraQ5. The scale bar represents 20μm. For dispersion assays, the number of analyzed LGs (n) is indicated. Quantifications correspond to the mean of 3 independent experiments.

Figure 5: Toll/NFκB and EGFR pathways act independently on LG dispersion upon wasp parasitism

30H post parasitism, LGs where Spi is decreased in PSC cells (*antp>spi* KD, A) or where the EGFR pathway is switched off in MZ cells (*domeMESO>DER* DN, B) present a defect in LG dispersion. Quantifications are given in (C). pERK (red) is not expressed in LG cells without parasitism (D-D’), whereas 6H post wasp parasitism it is expressed in all LG cells except PSC cells (*col>GFP*, green) (E-E’). The overexpression of a secreted form of Spi (cleaved Spi: cSpi) in PSC cells doesn’t affect LG dispersion upon wasp parasitism (*col>cSpi*, F) and doesn’t rescue the LG dispersion defect observed when the Toll/NFκB pathway is switched off in PSC cells (*col>cactus>cSpi*, G). Quantifications are given in (H). Nuclei are labelled with DraQ5. The scale bar represents 20μm. The number of analyzed LGs (n) is indicated. Each quantification corresponds to the mean of 3 independent experiments.

Figure 6: A genetic network controlling LG dispersion upon wasp parasitism

Without parasitism, Dif expressed in PSC cells acts independently of Toll/NFκB activation to control LG homeostasis and PSC cell number (A). 6H post parasitism, ROS levels are increased in PSC cells and activate the Toll/NFκB pathway and the production of cSpi. cSpi will activate the EGFR pathway in MZ cells (B). Toll/NFκB and EGFR pathways act independently on LG dispersion to allow lamellocyte release into the hemolymph.

Supplementary figures

Sup. Figure 1: Dif but not Df is required for LG dispersion upon wasp parasitism

30H post parasitism, LG dispersion defects are observed in +/J4 (A) and *d11/J4* heterozygous mutant larvae (B). A stronger LG dispersion defect is observed in *dif1/J4* larvae (C). Quantifications of LG dispersion are given in (D). The scale bar represents 20µm. The number of analyzed LGs (n) is indicated. Quantifications correspond to the mean of 3 independent experiments.

Sup. Figure 2: D4-lacZ is expressed in PSC cells in *d11* null mutant LGs

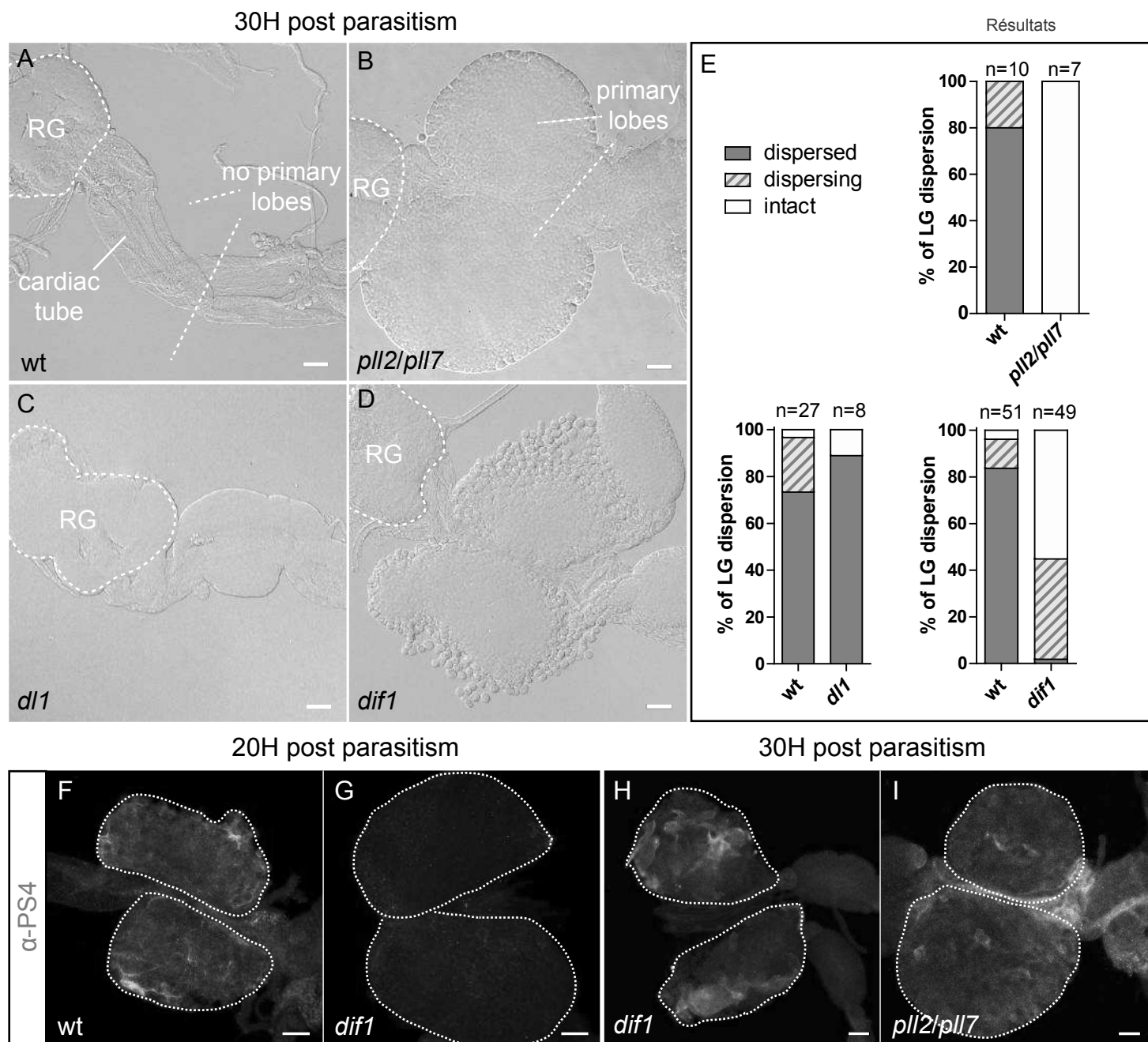
Without parasitism, in a *d11* null mutant, D4-lacZ (red) is expressed in PSC cells (Col, green) as in controls (A to A''). 6H post parasitism D4-lacZ (red) is expressed in PSC and MZ cells (B to B''). Nuclei are labeled with Topro3 (blue). The scale bar represents 20µm.

Sup. Figure 3: Without parasitism Dif in PSC cells regulates LG homeostasis and PSC cell number

In the absence of an immune challenge, DomeMESO-GFP, which labels MZ cells (green), is reduced in *dif1* null mutant or when Dif is decreased in PSC cells (A to C). Quantifications are given in (D). Fewer differentiated crystal cells (ProPO, green) are detected in *dif1* null mutant or when Dif expression is decreased in PSC cells (E to G). Quantifications are given in (H). Compared to the control (I), the number of PSC cells (Col, green) is increased in *dif1* null mutant (J) or when Dif is decreased in PSC cells (K), whereas Toll10B overexpression in PSC cells leads to a decrease in PSC cell number (L). Quantifications are given in (M). Nuclei are labeled with Topro3. The scale bar represents 20µm.

Sup. Figure 4: In the absence of an immune challenge, ectopic activation of the Toll/NFκB pathway or overexpression of cSpi in PSC cells induces lamellocyte differentiation but not LG dispersion

Compared to wt (A), when the Toll/NFκB pathway (*col>Toll^{10B}*, B) or when cSpi (*col>cSpi*, C) is overexpressed in PSC cells, differentiated lamellocytes (α-PS4, green) are detected in LGs in the absence of wasp parasitism. PSC cells are labeled by Col (red) and the nuclei with Topro3 (blue). The scale bar represents 20μm.



20H post parasitism

30H post parasitism

F

wt

G

dif1

H

dif1

I

pll2/pll7

Figure 1

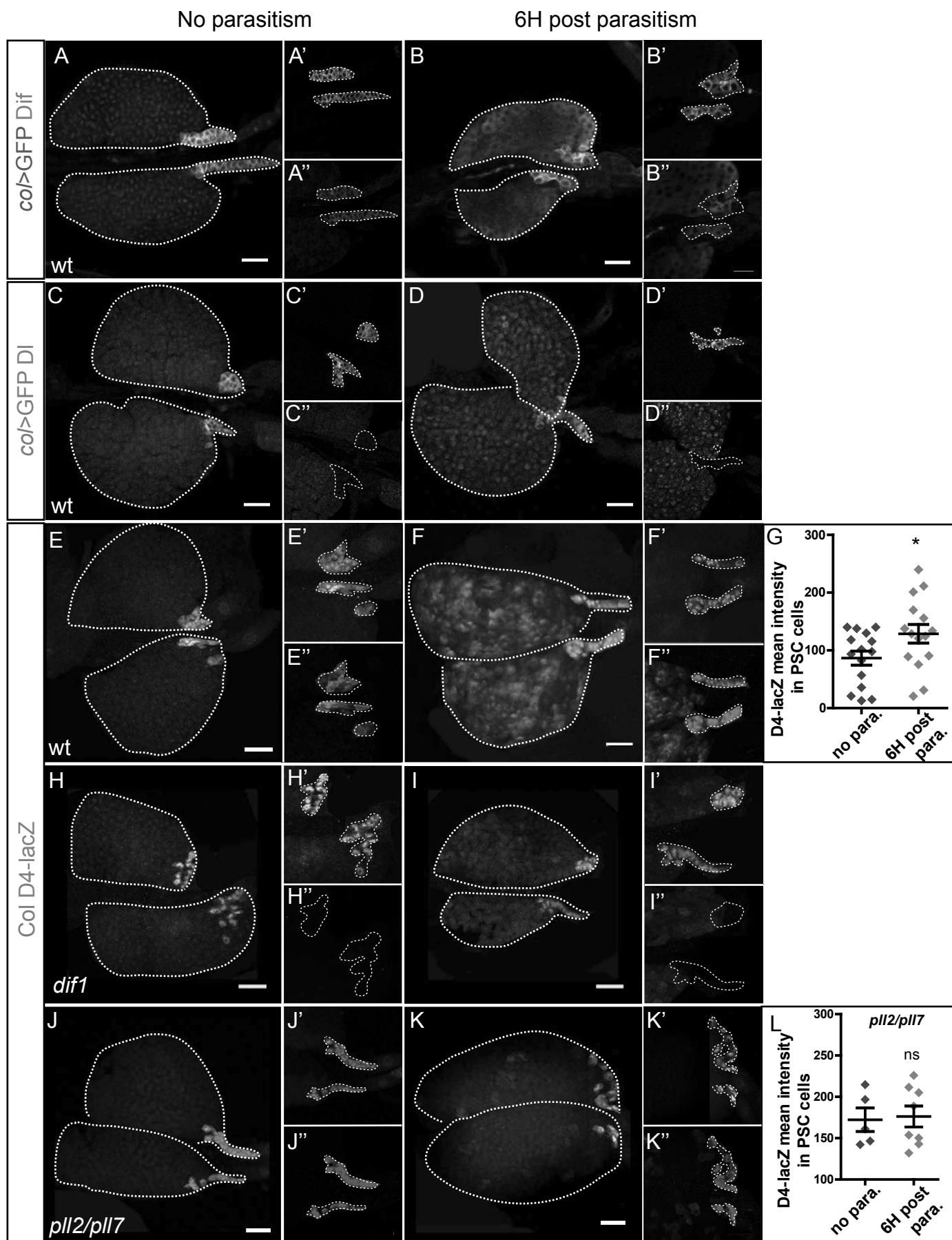


Figure 2

30H post parasitism

Résultats

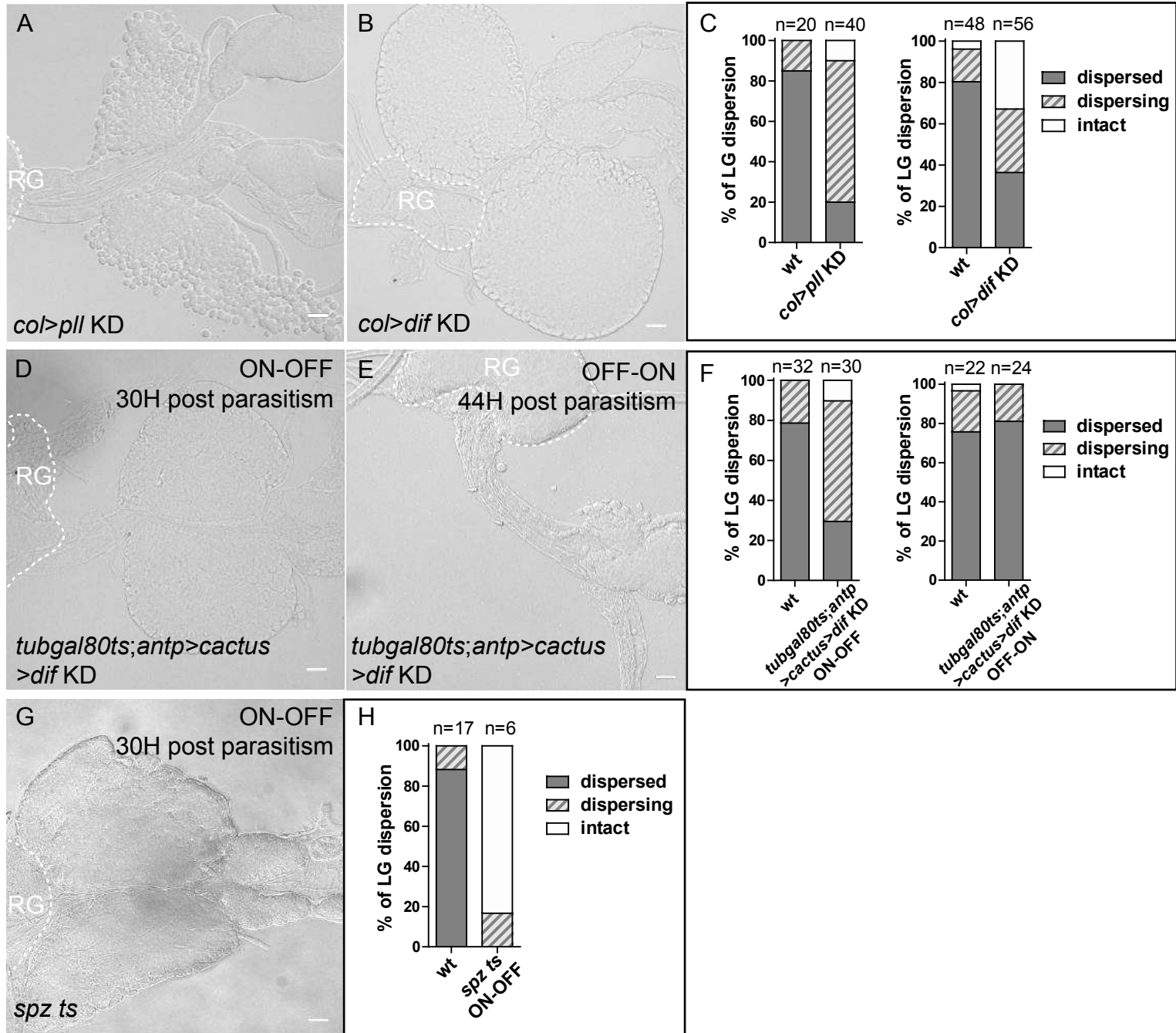


Figure 3

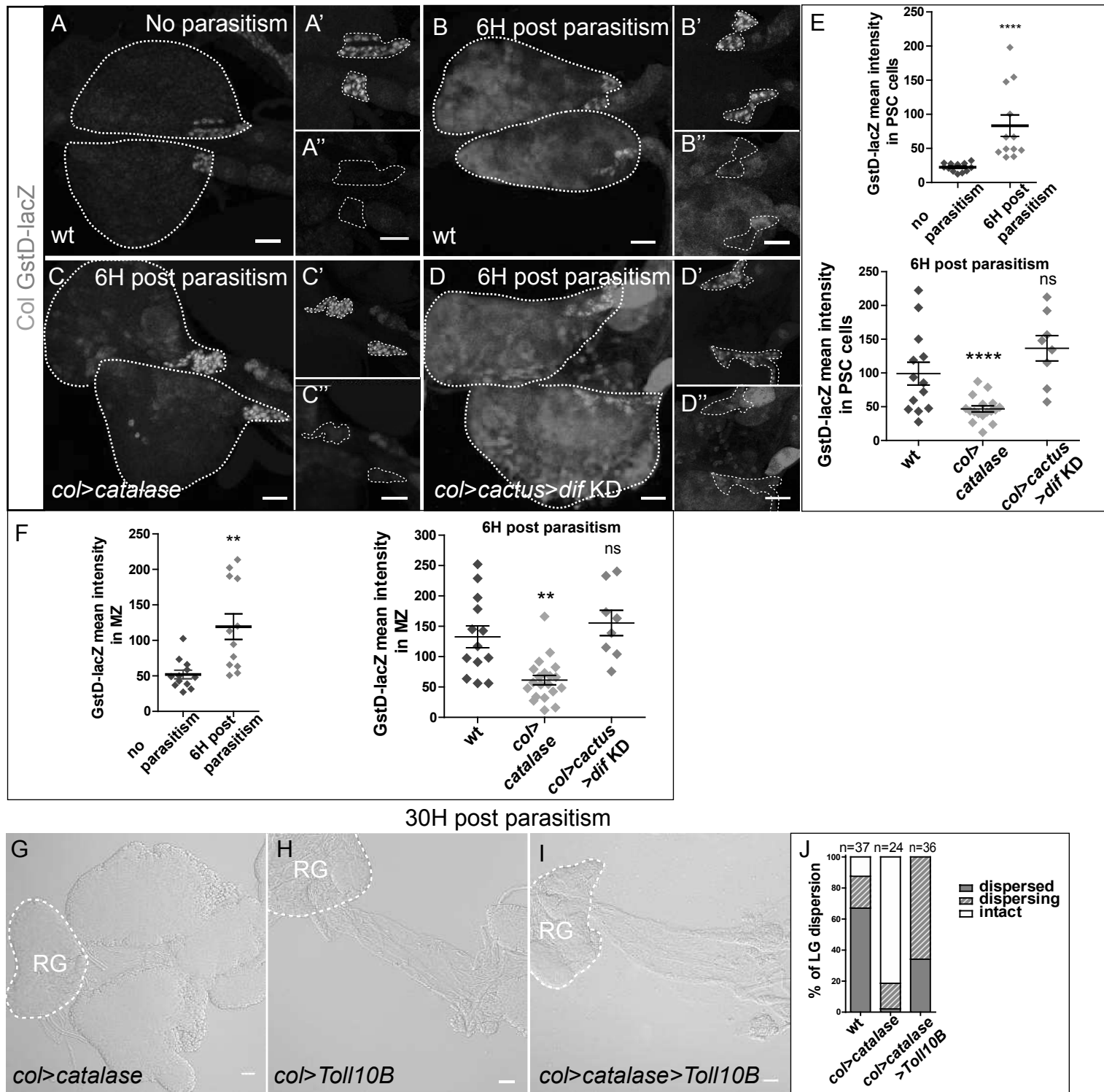


Figure 4

30H post-parasitism

Résultats

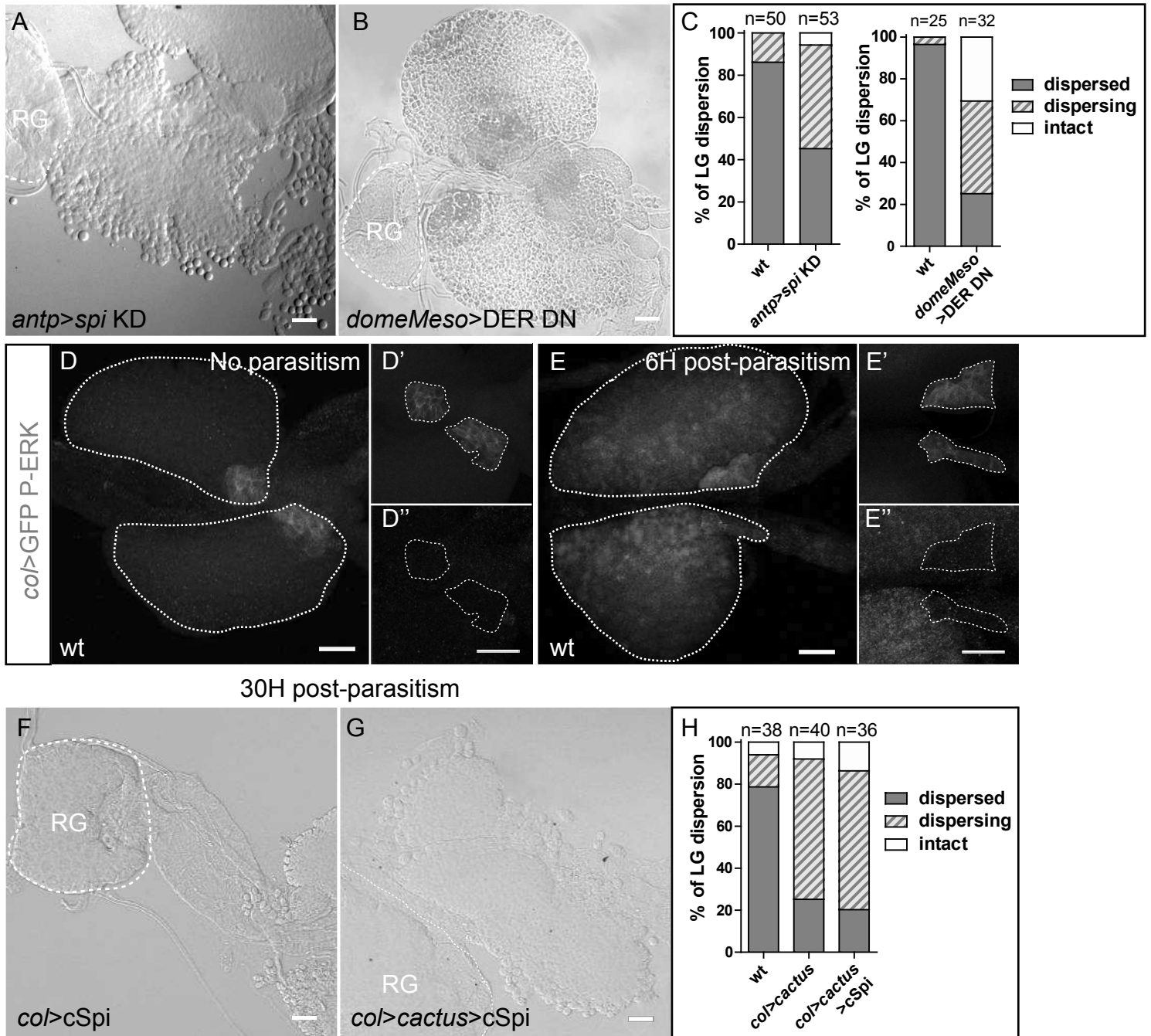


Figure 5

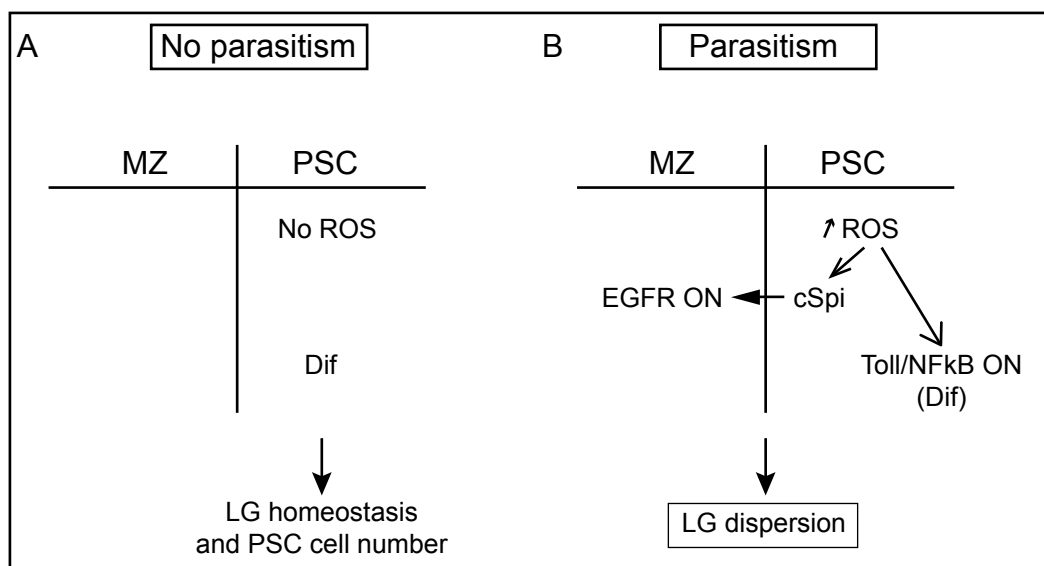
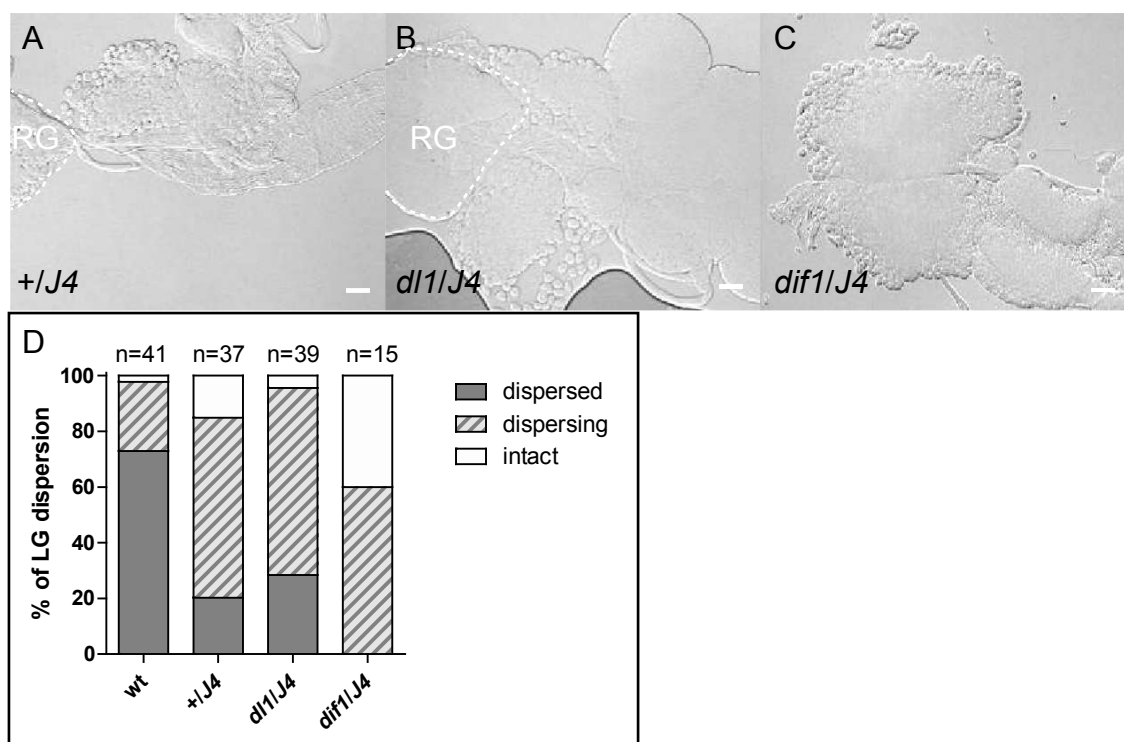
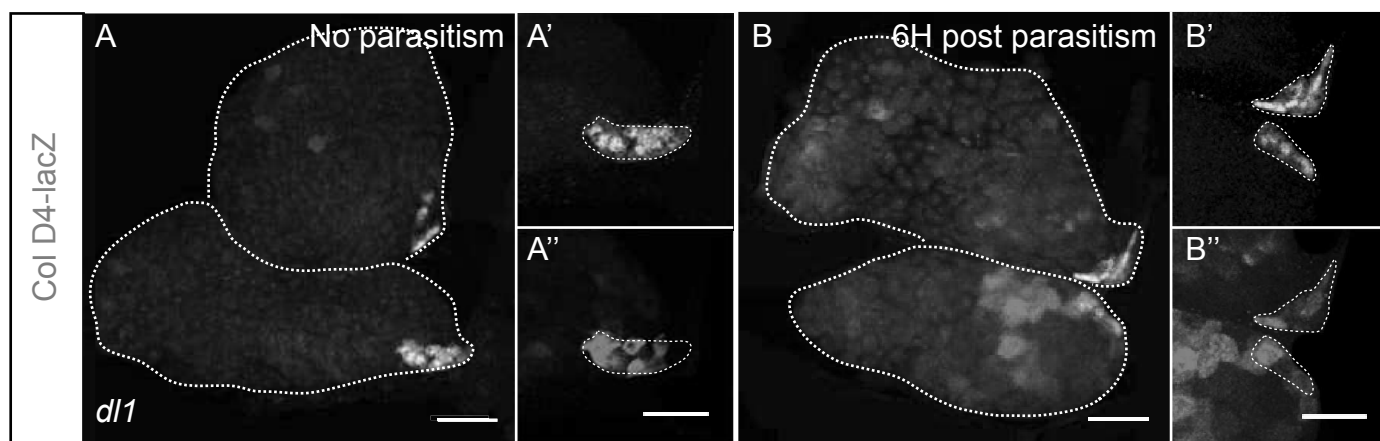


Figure 6

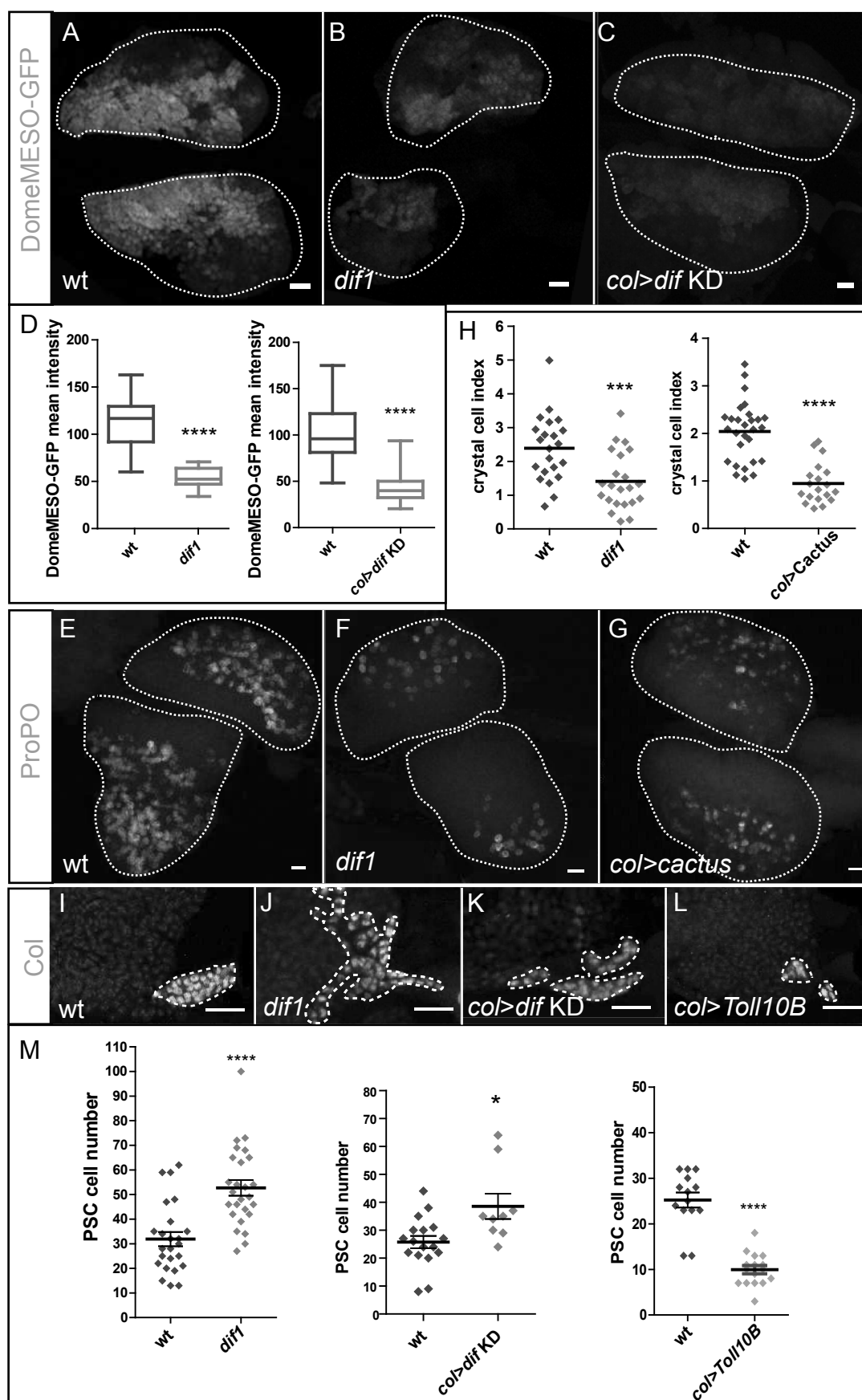
30H post parasitism



Sup. Figure 1

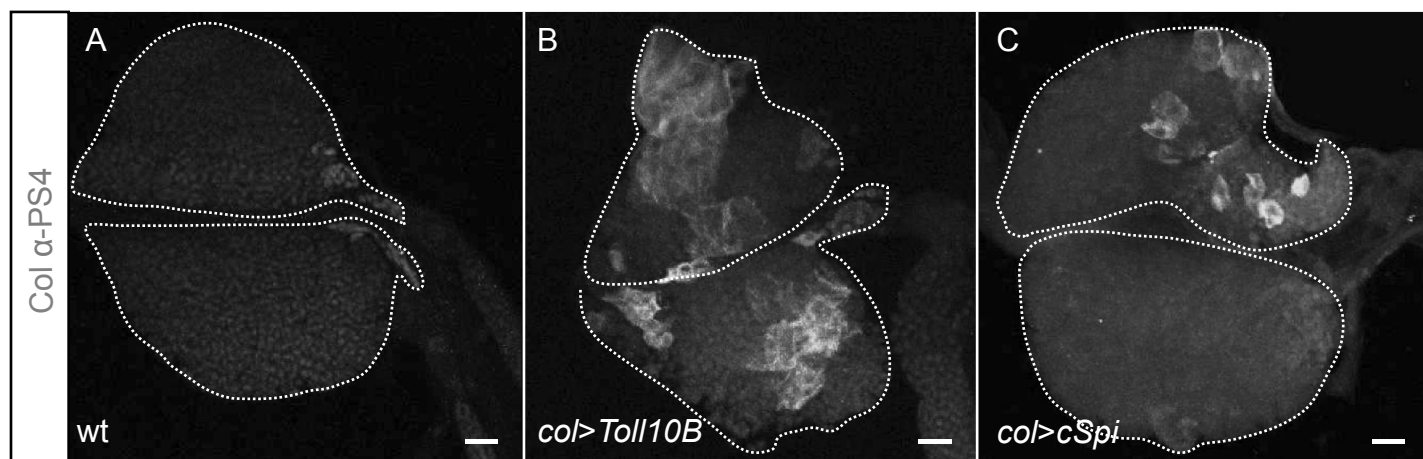


Sup. Figure 2



Sup. Figure 3

No parasitism



Sup. Figure 4

Bibliography

Al-Drees, M.A., Yeo, J.H., Boumelhem, B.B., Antas, V.I., Brigden, K.W., Colonne, C.K., and Fraser, S.T. (2015). Making Blood: The Haematopoietic Niche throughout Ontogeny. *Stem Cells Int* 2015, 571893.

Benmimoun, B., Polesello, C., Waltzer, L., and Haenlin, M. (2012). Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in *Drosophila*. *Development* 139, 1713-1717.

Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., and Xi, Z. (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* 6, e1000833.

Crozatier, M., Ubeda, J.M., Vincent, A., and Meister, M. (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier*. *PLoS Biol* 2, E196.

Dragojlovic-Munther, M., and Martinez-Agosto, J.A. (2012). Multifaceted roles of PTEN and TSC orchestrate growth and differentiation of *Drosophila* blood progenitors. *Development* 139, 3752-3763.

Flores-Saaib, R.D., Jia, S., and Courey, A.J. (2001). Activation and repression by the C-terminal domain of Dorsal. *Development* 128, 1869-1879.

Gueguen, G., Kalamarz, M.E., Ramroop, J., Uribe, J., and Govind, S. (2013). Polydn viral ankyrin proteins aid parasitic wasp survival by coordinate and selective inhibition of hematopoietic and immune NF-kappa B signaling in insect hosts. *PLoS Pathog* 9, e1003580.

Gupta, S.C., Singh, R., Pochampally, R., Watabe, K., and Mo, Y.Y. (2014). Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF-kB pathway. *Oncotarget* 5, 12070-12082.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). NF-kB in immunobiology. *Cell Res* 21, 223-244.

Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (2009). NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000232.

Jung, S.H., Evans, C.J., Uemura, C., and Banerjee, U. (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132, 2521-2533.

Keebaugh, E.S., and Schlenke, T.A. (2014). Insights from natural host-parasite interactions: the *Drosophila* model. *Dev Comp Immunol* 42, 111-123.

Krzemien, J., Oyallon, J., Crozatier, M., and Vincent, A. (2010). Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Dev Biol* 346, 310-319.

Krzemień, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., and Crozatier, M. (2007). Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 446, 325-328.

Lam, V., Tokusumi, T., Tokusumi, Y., and Schulz, R.A. (2014). bantam miRNA is important for *Drosophila* blood cell homeostasis and a regulator of proliferation in the hematopoietic progenitor niche. *Biochem Biophys Res Commun* 453, 467-472.

Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 230, 243-257.

Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25, 697-743.

Makki, R., Meister, M., Pernetier, D., Ubeda, J.M., Braun, A., Daburon, V., Krzemień, J., Bourbon, H.M., Zhou, R., Vincent, A., *et al.* (2010). A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response. *PLoS Biol* 8, e1000441.

- Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., Evans, C.J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2007). A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* **446**, 320-324.
- McGuire, S.E., Le, P.T., Osborn, A.J., Matsumoto, K., and Davis, R.L. (2003). Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**, 1765-1768.
- Meng, X., Khanuja, B.S., and Ip, Y.T. (1999). Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF-kappaB factor. *Genes Dev* **13**, 792-797.
- Mondal, B.C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C.J., Sinenko, S.A., Martinez-Agosto, J.A., and Banerjee, U. (2011). Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* **147**, 1589-1600.
- Mondal, B.C., Shim, J., Evans, C.J., and Banerjee, U. (2014). Pvr expression regulators in equilibrium signal control and maintenance of *Drosophila* blood progenitors. *Elife* **3**, e03626.
- Márkus, R., Kurucz, E., Rus, F., and And  , I. (2005). Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunol Lett* **101**, 108-111.
- Neuburger, P.J., Saville, K.J., Zeng, J., Smyth, K.A., and Belote, J.M. (2006). A genetic suppressor of two dominant temperature-sensitive lethal proteasome mutants of *Drosophila melanogaster* is itself a mutated proteasome subunit gene. *Genetics* **173**, 1377-1387.
- Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A.S., and Xi, Z. (2012). Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E23-31.
- Pennetier, D., Oyallon, J., Morin-Poulard, I., Dejean, S., Vincent, A., and Crozatier, M. (2012). Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 3389-3394.
- Qiu, P., Pan, P.C., and Govind, S. (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* **125**, 1909-1920.
- Rivas, M.L., Cobreros, L., Zeidler, M.P., and Homb  ria, J.C. (2008). Plasticity of *Drosophila* Stat DNA binding shows an evolutionary basis for Stat transcription factor preferences. *EMBO Rep* **9**, 1114-1120.
- Rizki, T.M., and Rizki, R.M. (1992). Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Dev Comp Immunol* **16**, 103-110.
- Saxena, A., Denholm, B., Bunt, S., Bischoff, M., VijayRaghavan, K., and Skaer, H. (2014). Epidermal growth factor signalling controls myosin II planar polarity to orchestrate convergent extension movements during *Drosophila* tubulogenesis. *PLoS Biol* **12**, e1002013.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25.
- Sinenko, S.A., Shim, J., and Banerjee, U. (2012). Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*. *EMBO Rep* **13**, 83-89.
- Sorrentino, R.P., Carton, Y., and Govind, S. (2002). Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Dev Biol* **243**, 65-80.
- Sorrentino, R.P., Melk, J.P., and Govind, S. (2004). Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics* **166**, 1343-1356.
- Sudarsan, V., Pasalodos-Sanchez, S., Wan, S., Gampel, A., and Skaer, H. (2002). A genetic hierarchy establishes mitogenic signalling and mitotic competence in the renal tubules of *Drosophila*. *Development* **129**, 935-944.

Sykiotis, G.P., and Bohmann, D. (2008). Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 14, 76-85.

Wang, M.C., Bohmann, D., and Jasper, H. (2003). JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 5, 811-816.

II. La voie JAK/STAT et la réponse de la GL au parasitisme par des guêpes

La voie JAK/STAT est l'une des voies de signalisation connue pour intervenir dans la GL lors de la réponse au parasitisme par des guêpes (Makki et al., 2010 ; cf introduction). Au cours de ma thèse, j'ai donc été amenée à étudier plus en détails le rôle de cette voie de signalisation dans la réponse au parasitisme ainsi que ses liens potentiels avec la voie Toll/NFκB. Les résultats présentés restent préliminaires et des analyses complémentaires seront nécessaires.

A) La voie JAK/STAT contrôle la dispersion de la GL

Précédemment, il a été montré que la voie JAK/STAT est active dans les cellules de la ZM en absence de challenge immun, puis est inactivée dans ces mêmes cellules 4H après parasitisme. Cette inhibition est nécessaire à la différenciation massive de lamellocytes dans la GL (Makki et al., 2010). Pour ma part, j'ai entrepris de déterminer si l'activité de cette voie ainsi que celle de son ligand dans la GL, Upd3, sont requises à la dispersion de la GL en réponse au parasitisme. Pour cela j'ai inactivé la voie JAK/STAT dans la ZM puis j'ai analysé la dispersion de la GL 30H après parasitisme. L'inhibition de la voie JAK/STAT a été réalisée en surexprimant simultanément sous le contrôle du pilote d'expression spécifique de la ZM *dome-gal4* deux facteurs inhibiteurs de la voie : Latran, récepteur tronqué de la voie JAK/STAT (UAS-*latran*), et une forme dominante-négative du récepteur Dome (UAS-*domeDN*). Après parasitisme, l'inhibition dans la ZM de l'activité de la voie JAK-STAT (*dome>latran>domeDN*) conduit à un défaut de dispersion de la GL (Figure 27-A). Ceci indique que l'activité de la voie JAK/STAT est requise dans la ZM à la dispersion de la GL.

Dans un second temps, j'ai cherché à déterminer quand est requise la voie JAK/STAT dans la GL pour la réponse au parasitisme. Pour cela j'ai analysé la dispersion de la GL après avoir inactivé la voie JAK/STAT dans la ZM soit après parasitisme, soit au contraire avant parasitisme.

- Pour inhiber la voie JAK/STAT uniquement après parasitisme, j'ai placé les transgènes UAS-*latran* et UAS-*domeDN* sous le contrôle du pilote d'expression *difVT-Gal4*. Ce pilote n'est pas exprimé dans la GL en absence de parasitisme

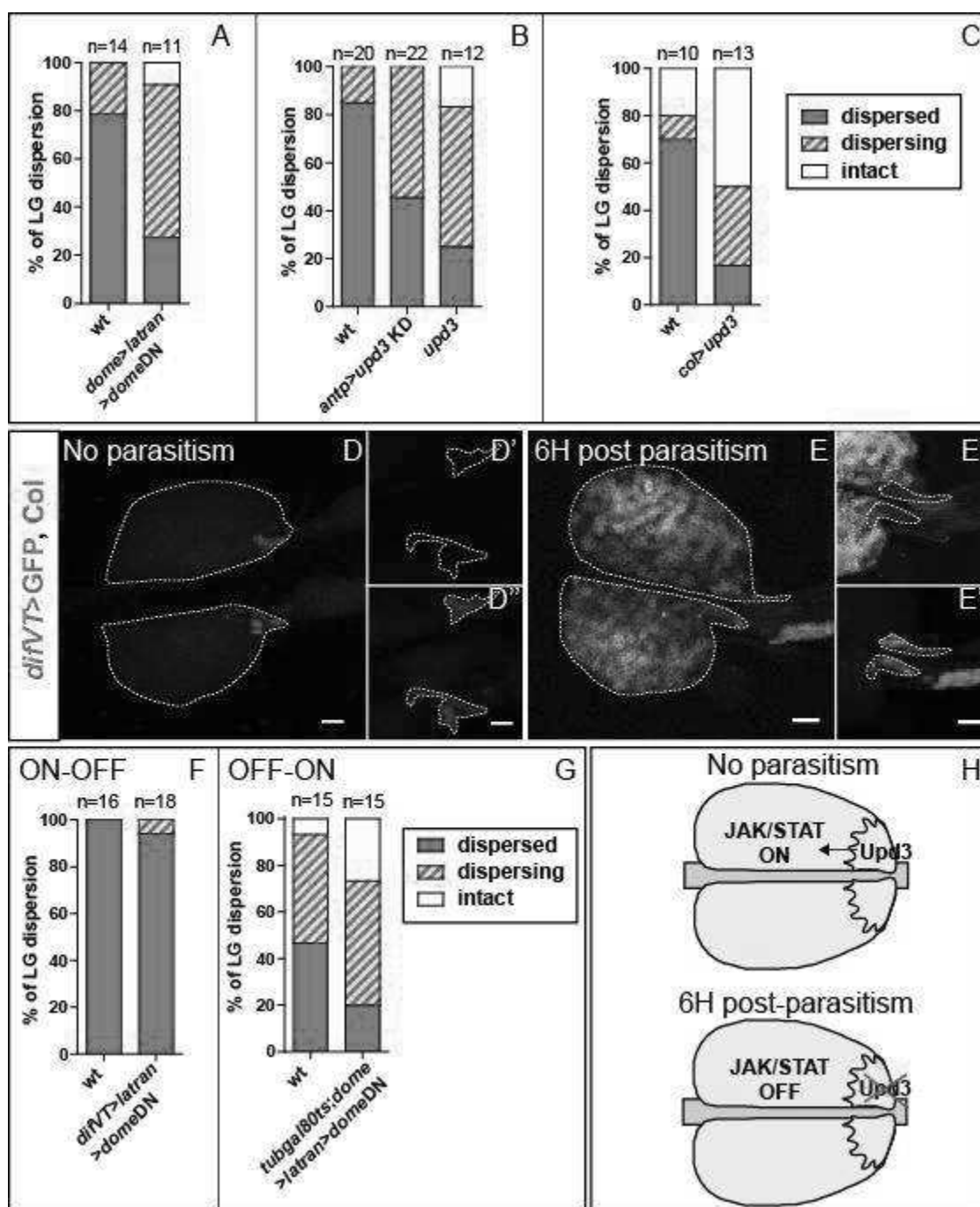


Figure 27 : La régulation de l'activité de la voie JAK/STAT est requise pour permettre la dispersion de la GL en réponse au parasitisme par des guêpes

30H après parasitisme, la dispersion de la GL reste incomplète lorsque la voie JAK/STAT est inactivée dans la ZM (*dome>latran>domeDN*) (A). Un défaut similaire est observé dans le mutant *upd3* et lorsqu'*upd3* est inhibé dans le PSC (*antp>upd3 KD*) (B). Une surexpression d'*upd3* dans le PSC entraîne également un défaut de dispersion de la GL après parasitisme (C).

Le pilote d'expression *difVT>GFP* (vert) n'est pas exprimé dans la GL en absence de parasitisme (D), et s'exprime fortement dans la ZM 6H après parasitisme (E). Il n'est jamais exprimé dans le PSC (rouge). L'inactivation de la voie JAK/STAT dans la ZM uniquement après parasitisme, par l'expression des transgènes *UAS-latran*; *UAS-domeDN* sous le contrôle du pilote *difVT*, ne conduit pas à un défaut de dispersion de la GL (ON-OFF : F). En revanche, l'inactivation de la voie JAK/STAT dans la ZM pendant le développement, et son activation au moment du parasitisme conduit à un défaut de dispersion de la GL (OFF-ON : G). Une représentation schématique du rôle de la voie JAK/STAT dans le contrôle de la dispersion de la GL après parasitisme est présentée en H.

Barre d'échelle : 20µm (D-E). Les noyaux sont marqués par Topro3 (bleu).

(Figure 27-D), et s'exprime 6H après parasitisme dans la ZM mais pas dans le PSC (Figure 27-E). Aucun défaut de dispersion de la GL n'est observé lorsque la voie JAK/STAT est inactivée dans la ZM uniquement après parasitisme (*difVT>latran>domeDN*; Figure 27-F), ce qui suggère que l'activité JAK/STAT n'est pas requise après parasitisme. Ces résultats sont en accord avec les données publiées précédemment indiquant que 4H après parasitisme la voie JAK/STAT doit être inactive dans la ZM pour permettre la production massive de lamellocytes dans la GL (Makki et al., 2010).

- Pour inhiber la voie JAK/STAT tout au long du développement, puis l'activer uniquement lors du parasitisme, j'ai utilisé une combinaison du répresseur thermosensible Gal80ts et du pilote d'expression *dome-gal4* pour diriger l'expression des transgènes UAS-*latran* et UAS-*domeDN* dans la ZM. Le système Gal4/Gal80ts permet, en jouant sur la température, une activation conditionnelle du pilote d'expression Gal4. Il faut noter que dans ces conditions de température les GLs sauvages présentent un taux de dispersion après parasitisme inférieur à celui observé lorsque les larves restent à 27°C. Les GLs des larves *tubgal80ts; dome>latran>domeDN* présentent un phénotype modéré de défaut de dispersion après parasitisme : 20% des GLs sont dispersées, comparé à 47% pour les GLs contrôles (Figure 27-G). Ces données suggèrent que la voie JAK/STAT est requise dans la ZM avant parasitisme pour permettre la dispersion de la GL.

Par ailleurs, 30H après parasitisme, contrairement à des GLs sauvages, les GLs de larves mutantes pour *upd3* présentent aussi un défaut de dispersion (Figure 27-B). De façon intéressante, l'expression d'un ARN interférent dirigé contre *upd3* dans le PSC conduit à un phénotype similaire (*antp>upd3 KD*; Figure 27-B). Ces résultats indiquent que le ligand Upd3 est requis dans le PSC à la dispersion de la GL après parasitisme. Enfin, de façon surprenante, la surexpression dans le PSC d'*upd3* (*col>upd3*) conduit, tout comme son inhibition, à un défaut de dispersion de la GL après parasitisme (Figure 27-C).

L'ensemble de ces résultats permet de proposer le modèle suivant (Figure 27-H): avant parasitisme, la voie JAK/STAT est activée dans les cellules de la ZM, par son ligand Upd3 dont une des sources est le PSC. 4H après parasitisme, elle est

inactivée afin de permettre la différenciation massive des lamellocytes dans la GL (Makki et al., 2010). Après parasitisme, le niveau d'expression d'*upd3* dans la GL chute drastiquement (Makki et al., 2010), tandis que la surexpression d'*upd3* dans le PSC conduit à un défaut de dispersion de la GL après parasitisme. Ces données, en accord avec le modèle précédent, suggèrent que le ligand Upd3 doit être rapidement inhibé dans le PSC pour permettre l'extinction de la voie JAK/STAT. L'une des questions en suspens était ensuite de déterminer de quoi dépend l'activité de la voie JAK/STAT dans la ZM, et quelle est sa fonction.

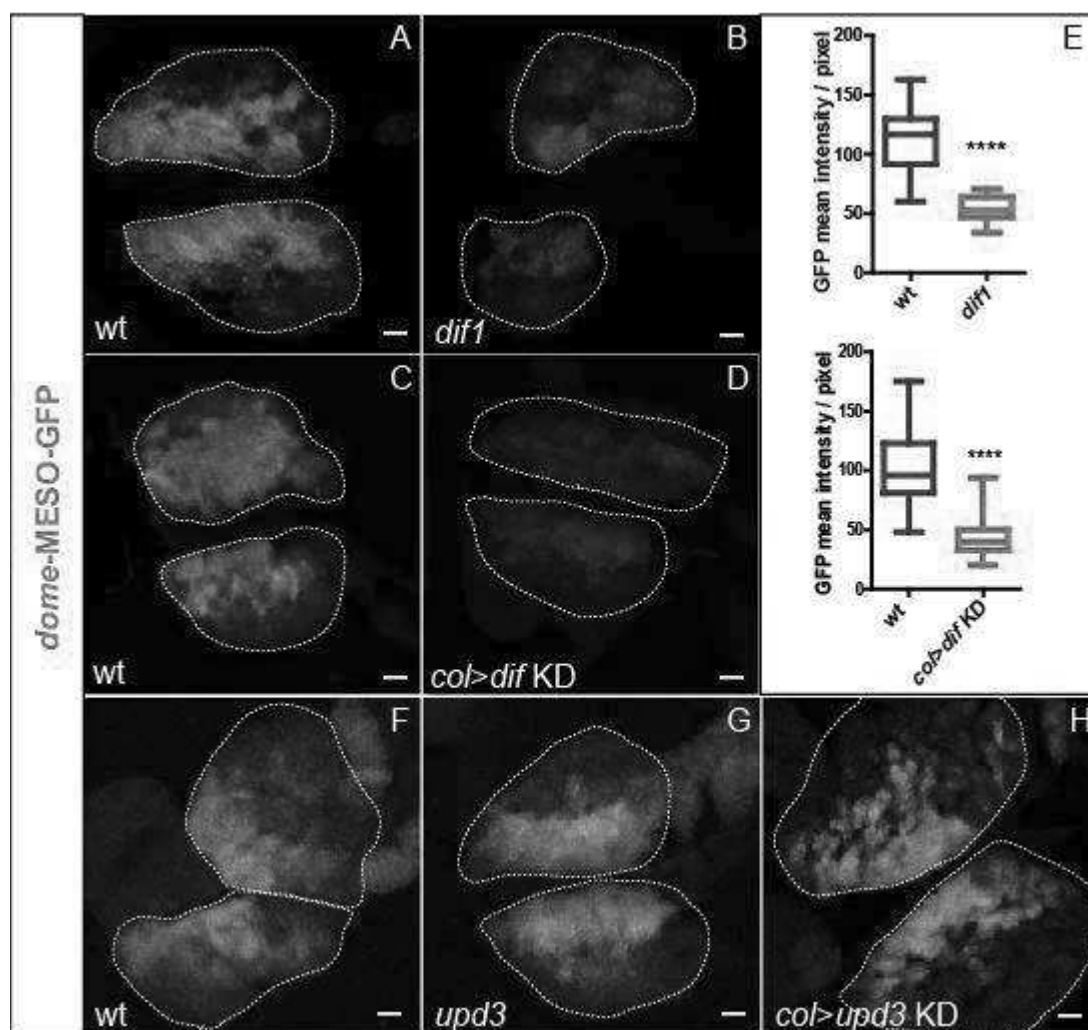


Figure 28 : Dif contrôle-t-il l'activité de la voie JAK/STAT dans la GL ?

Le niveau d'expression du transgène *dome-MESO-GFP* (vert) est fortement réduit dans le mutant *dif1* (A-B) et après inhibition de Dif dans le PSC (C-D ; quantifications en E).

Le transgène *dome-MESO-GFP* est toujours exprimé dans la GL dans le mutant *upd3* ou après inactivation d'*upd3* dans le PSC (F à H).

Barre d'échelle : 20µm.

B) Existe-t-il un lien fonctionnel entre Dif et la voie JAK/STAT dans la GL lors de la réponse au parasitisme ?

L'inactivation de la voie Toll/NFκB dans le PSC ou de la voie JAK/STAT dans la ZM conduisent à un phénotype équivalent, à savoir un défaut de dispersion de la GL après parasitisme. La question qui se posait était de déterminer si ces deux voies de signalisation interviennent dans un même réseau de régulation génétique dans la GL lors de la réponse au parasitisme. Cependant, j'ai observé que l'activité de la voie JAK/STAT est nécessaire avant parasitisme et non après pour permettre la dispersion de la GL; contrairement à la voie Toll/NFκB qui est induite et requise dans le PSC après parasitisme (cf résultats I). Il est donc difficile d'envisager une épistasie entre elles lors du contrôle de la dispersion de la GL suite au parasitisme. Toutefois, des données suggèrent une régulation possible entre le facteur de transcription Dif (indépendamment de la voie Toll/NFκB) et la voie JAK/STAT en absence de parasitisme. J'ai analysé l'expression du transgène *domeMESO-GFP*, décrit comme un rapporteur de l'activité JAK/STAT (cf matériel et méthodes), dans la GL dans un contexte où l'expression de Dif est modifiée. Dans un mutant nul *dif1* ou lorsque *dif* est inhibé spécifiquement dans le PSC (*col>cactus>dif* KD) on observe une nette diminution du niveau d'expression du transgène *domeMESO-GFP* dans la ZM par rapport à des GL contrôles (Figure 28-A à E), suggérant que l'activation de la voie JAK/STAT est dépendante de l'expression de Dif dans le PSC. J'ai par la suite cherché à savoir si l'expression du ligand possible de voie JAK/STAT dans le PSC, Upd3, est sous la dépendance de Dif. Pour cela, j'ai analysé l'expression du pilote *upd3-gal4*, qui correspond à un morceau du promoteur de *upd3* cloné en amont de la séquence codante de *gal4* (Agaisse et al., 2003). En absence de parasitisme, le pilote *upd3-gal4* est exprimé dans le PSC et dans quelques cellules de la ZM et/ou de la ZC (Figure 29-A). L'inactivation de Dif sous le contrôle de ce pilote d'expression (*upd3>GFP>cactus>dif* KD) conduit à une très forte diminution du niveau d'expression de la GFP dans le PSC (Figure 29-C). Cette donnée suggère qu'en absence de parasitisme l'expression du ligand Upd3 dans le PSC est contrôlée par Dif. 6H après parasitisme, l'expression du pilote *upd3-gal4* est maintenue dans le PSC et une expression plus forte est détectée dans la ZM (Figure 29-B). Ce profil d'expression est en contradiction avec les données de RT-qPCR précédemment publiées, qui montrent que l'expression de l'ARNm *upd3* est rapidement perdue suite

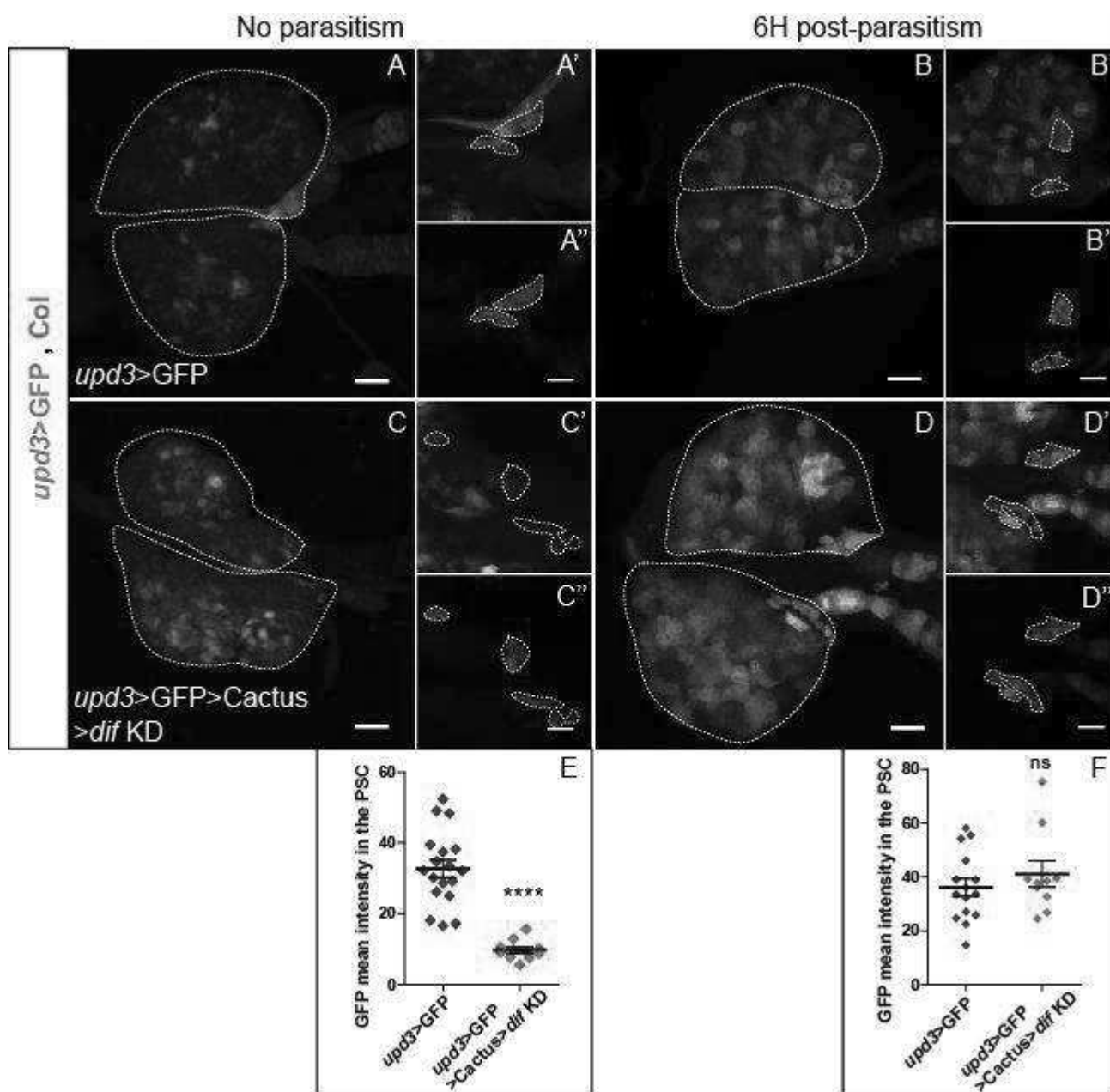


Figure 29 : Dif contrôle-t-il l'expression d'*upd3* dans le PSC ?

Le pilote *upd3>GFP* (vert) est exprimé dans le PSC (Col, rouge) et dans quelques cellules de la ZM en absence de parasitisme (A). Son expression dans la GL est maintenue 6H après parasitisme, aussi bien dans le PSC que dans la ZM (B).

En absence de parasitisme, l'inactivation de *dif* sous le contrôle du pilote *upd3>GFP* conduit à une perte d'expression de la GFP dans le PSC (C) comparé à des larves contrôles. La quantification correspondante est donnée en (E).

6H après parasitisme, le niveau de GFP dans le PSC est comparable dans les larves *upd3>GFP>Cactus>dif* KD et dans les larves contrôles (D; quantification en F).

Barre d'échelle : 20 μm (A-D-F). Les noyaux sont marqués par Topro3 (bleu)

au parasitisme (Makki et al., 2010). Ceci suggère que le pilote *upd3-gal4* ne contient pas toutes les séquences de régulation du gène endogène *upd3*, et n'est donc pas un rapporteur fidèle de l'expression de ce gène dans la GL en condition de parasitisme. En accord avec cette idée, 6H après parasitisme, le niveau de GFP détecté dans le PSC dans le contexte *upd3>GFP>cactus>dif* KD est comparable à celui observé dans le PSC de larves contrôles parasitées (Figure 29-D).

Par ailleurs, l'expression du transgène *domeMESO-GFP* n'est pas modifiée dans la GL dans le mutant nul *upd3*, ni lorsqu'*upd3* est inhibé dans le PSC (Figure 28-F à H). Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer ces résultats :

- Upd3 pourrait, contrairement à ce qui est pensé jusqu'à présent, ne pas être le seul ligand de la voie JAK/STAT dans la GL. Une redondance fonctionnelle entre Upd3 et Upd1 et/ou Upd2 permettrait d'expliquer pourquoi l'absence d'Upd3 n'est pas suffisante pour éteindre l'expression du rapporteur *domeMESO-GFP* ; et par extension de la voie JAK/STAT.

- Une autre hypothèse serait que le transgène *domeMESO-GFP* ne se comporte en réalité pas comme un rapporteur de l'activité JAK/STAT. Dans ce cas, la perte d'expression de ce transgène dans le mutant *dif1* est en fait révélatrice d'un changement d'identité des cellules de la ZM, et non d'une modification de l'activité JAK/STAT. Cette hypothèse est probable, car l'inactivation de la voie JAK/STAT par la surexpression dans la ZM soit de Latran, soit de Socs36E, deux régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT, ne permet pas d'éteindre l'expression de la GFP (données non publiées de l'équipe) ; suggérant que le transgène *domeMESO-GFP* n'est pas sous le contrôle de la voie JAK/STAT et ne peut donc pas être utilisé pour suivre son activité.

Les mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité JAK/STAT dans la GL restent donc largement non élucidés. Leur identification est rendue difficile par les outils génétiques disponibles, qui pourraient ne pas refléter l'activité des gènes endogènes. Mes résultats suggèrent que Dif dans le PSC pourrait, en absence de stress immun, réguler l'expression d'Upd3 dans le PSC, et peut-être également l'activité de la voie JAK/STAT dans la ZM. D'autres acteurs non encore identifiés pourraient intervenir, pour permettre en particulier l'extinction d'*upd3* et de la voie JAK/STAT après parasitisme.

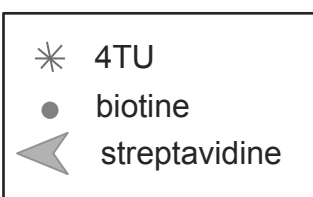
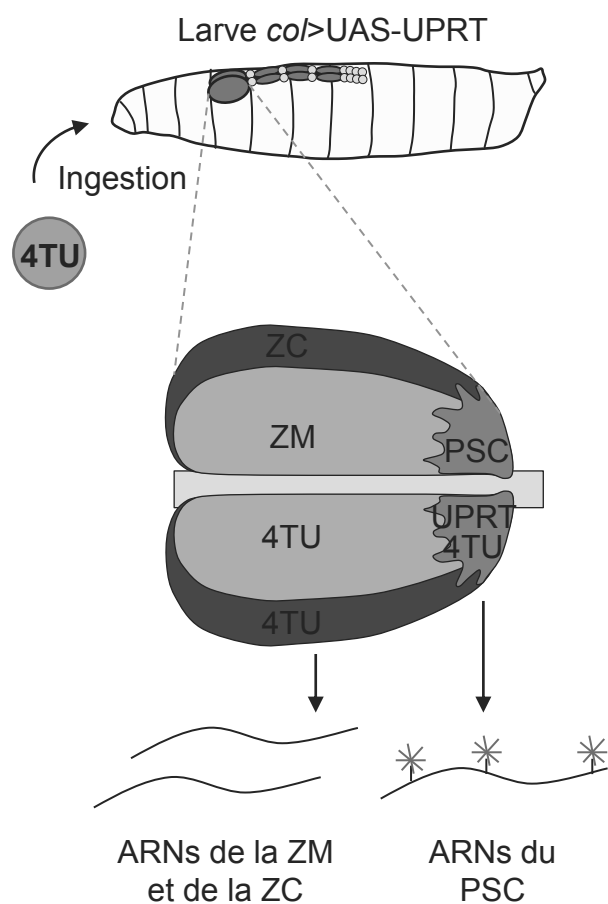
C) Conclusions

Lors de la réponse au parasitisme par des guêpes, une régulation dynamique de l'activité de la voie JAK/STAT est observée. Les mécanismes impliqués ainsi que le rôle du PSC restent à élucider. La dissection des régulations croisées entre la voie JAK/STAT et Dif et/ou la voie Toll/NFκB reste à ce jour fragmentaire, et nécessite une étude plus approfondie.

III. Etablissement du transcriptome des cellules du PSC : adaptation de la technique de « TU-tagging »

Au cours de ma thèse, l'axe majeur de ma recherche a été d'étudier le rôle du PSC lors du parasitisme par des guêpes. L'absence du PSC, observée dans le mutant *col* ou provoquée par la surexpression du gène pro-apoptotique *reaper* sous le contrôle du pilote d'expression spécifique du PSC *col-gal4*, résulte en l'absence de production massive de lamellocytes dans la GL après parasitisme. Ces résultats établissent l'importance de ces cellules dans la mise en place de la réponse immunitaire (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007). Récemment, les travaux de Sinenko et col. (2012) ont établi que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont surexprimées dans le PSC suite à un parasitisme par des guêpes ; cette surexpression étant requise à l'encapsulation des œufs de guêpes. Mes résultats sur l'analyse du rôle de la voie Toll/NFκB révèlent également une fonction clé du PSC dans la réponse au parasitisme (cf résultats I). Cependant l'identification des acteurs moléculaires impliqués reste fragmentaire. Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait déjà réalisé des analyses transcriptomiques afin d'identifier les ARNs exprimés dans le PSC. Ces analyses ont été réalisées à partir de GL entières disséquées provenant de larves de différents contextes génétiques, et les ARNs obtenus après dissection ont été déposés sur puces Affymetrix. Cette approche n'avait cependant pas permis la détection de certaines espèces d'ARN dont le rôle clé dans le PSC est connu, comme par exemple *hh* ou *upd3*. Bien qu'essentiels à la fonction du PSC, ces ARNs sont exprimés à un très faible niveau et l'utilisation de GL entières ainsi que de puces Affymetrix, peu sensibles, n'a pas permis un niveau de résolution suffisant pour permettre leur détection. Ainsi, afin d'identifier tous les ARNs du PSC, même exprimés à un faible niveau, de nouvelles approches plus sensibles devaient être développées. Au cours de ma thèse, j'ai donc entrepris d'établir le transcriptome des cellules du PSC en absence de parasitisme et 6H après parasitisme. Pour cela je devais récupérer spécifiquement les ARNs du PSC, puis les identifier par RNAseq, technique plus sensible que les puces Affymetrix. La comparaison de ces deux transcriptomes avait pour but d'identifier les voies de signalisation et acteurs moléculaires nécessaires d'une part à la fonction de niche hématopoïétique du PSC en absence de challenge immun ; et d'autre part ceux requis en réponse à un stress immunitaire, en l'occurrence le parasitisme par des guêpes.

1) Incorporation du 4TU dans les ARNs du PSC



2) Sélection et identification des ARNs marqués

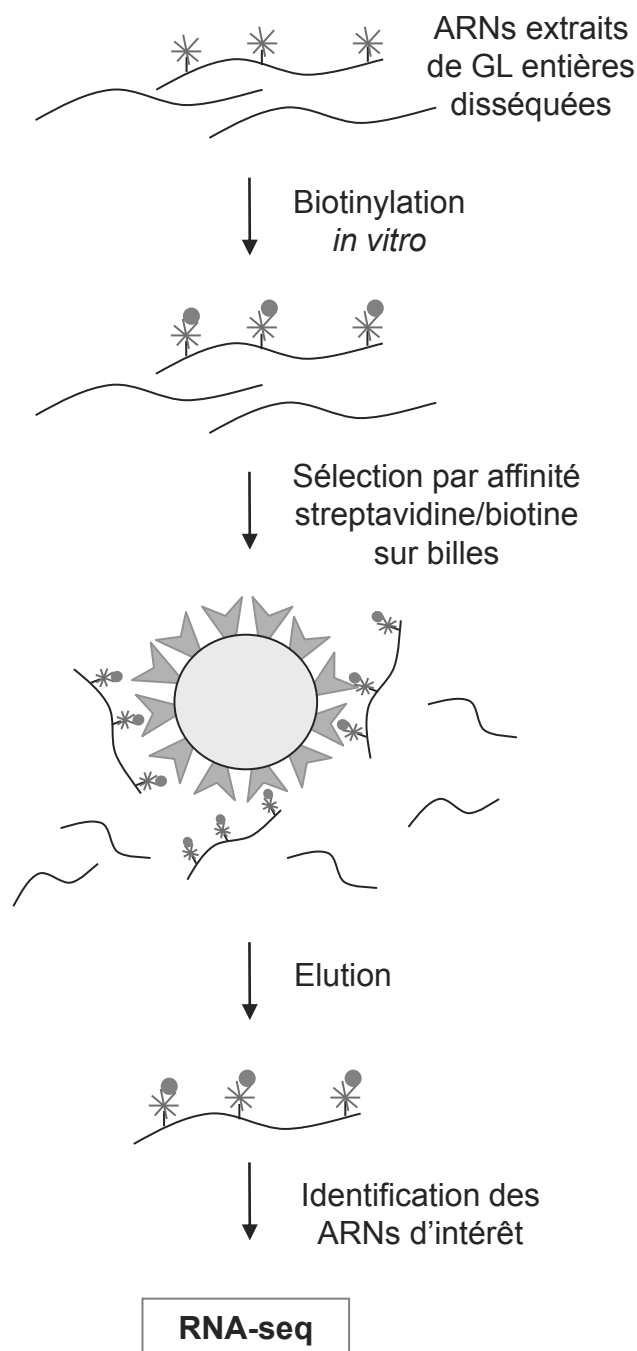


Figure 30 : Marquage et sélection des ARNs du PSC par la technique de « TU-tagging »

- 1) L'expression ciblée de l'UPRT dans le PSC (*co/UAS-UPRT*) combinée à l'ingestion de 4TU par les larves permet l'incorporation spécifique de nucléotides 4TU dans les ARNs du PSC.
- 2) La totalité des ARNs de la GL, composée d'un mélange d'ARNs de PSC marqués au 4TU et d'ARNs provenant de la ZM et de la ZC et non marqués, est extraite à partir de GL entières disséquées. Les résidus 4TU présents dans les ARNs du PSC sont ensuite biotinylés *in vitro*, puis retenus sur des billes magnétiques couplées à de la streptavidine. Après élution les ARNs seront séquencés.

A) Principe

Afin d'établir le transcriptome des cellules du PSC, j'ai entrepris d'adapter la technique de « TU-tagging », développée sur le cerveau de drosophile, à la GL (Miller et al., 2009). Le principe de cette technique est de marquer spécifiquement les ARNs transcrits dans un sous-ensemble de cellules au sein d'un tissu, pour pouvoir par la suite les sélectionner puis les identifier. Pour cela on utilise une enzyme, l'Uracile Phospho-Ribosyl Transférase (UPRT), n'existant pas chez la drosophile et permettant la conversion d'un dérivé de l'uracile, le 4thio-uracile (4TU), en 4thio-uridine. Contrairement au 4thio-uridine, qui peut remplacer l'uridine dans les ARN messagers (ARNm), le 4TU ne peut pas être incorporé dans les ARNm. Le principe est donc de nourrir les larves de drosophile avec du 4TU, qui sera présent dans toutes les cellules de l'organisme, et d'exprimer l'UPRT spécifiquement dans les cellules d'intérêt, en l'occurrence celles du PSC. Ainsi, dans ces cellules le 4TU pourra être converti en 4thio-uridine, puis incorporé dans les ARNs en cours de synthèse (Figure 30-₁). Par extraction d'ARNs à partir de GL entières disséquées, une population mixte d'ARNs, composée à la fois d'ARNs de PSC, contenant du 4TU, et d'ARNs provenant du reste de la GL, n'en contenant pas, sera obtenue. La sélection des ARNs du PSC étiquetés au 4TU se fait par biotinylation *in vitro* puis chromatographie d'affinité streptavidine/biotine. En effet, les molécules de biotine se lient au 4TU présent dans les ARNs du PSC. La totalité des ARNs de GLs est incubée avec des billes couplées à de la streptavidine (Figure 30-₂). La biotine et la streptavidine ayant une forte affinité, les ARNs 4TU-positifs, biotinylés, vont être retenus sur les billes, tandis que les ARNs non marqués ne le seront pas. Après élution, les ARNs de PSC ainsi récupérés pourront être séquencés à haut-débit (RNA-seq), ce qui devait permettre d'identifier des espèces d'ARN exprimés même à un faible niveau.

B) Méthodologie

Pour établir le transcriptome du PSC, la technique de « TU-tagging » a dû être adaptée à la GL. Pour cela différentes mises au point ont dû être réalisées :

- Dans un premier temps, il fallait vérifier que les différentes étapes nécessaires au marquage des ARNs du PSC (surexpression de l'UPRT, ingestion de 4TU...) ne créent pas de stress qui pourrait modifier l'homéostasie de la GL, organe particulièrement sensible à de nombreux stress, tels que la présence de radicaux libres.
- Après avoir mis au point des conditions compatibles avec le maintien d'une homéostasie normale de la GL, j'ai vérifié que des ARN étiquetés peuvent être détectés.
- J'ai ensuite testé la spécificité de la technique, en d'autre terme vérifié que les ARNs récupérés à la fin de l'expérience correspondent bien à des ARNs du PSC, et que ceux provenant des autres zones de la GL ne sont pas sélectionnés.
- Une fois ces étapes mises au point, un séquençage à haut-débit sur les échantillons obtenus en absence de parasitisme ou 6H après parasitisme devait être réalisé.

Cette méthodologie a été mise en œuvre et les différents points précédents ont été vérifiés. Cependant cette approche a été plus complexe que prévu initialement.

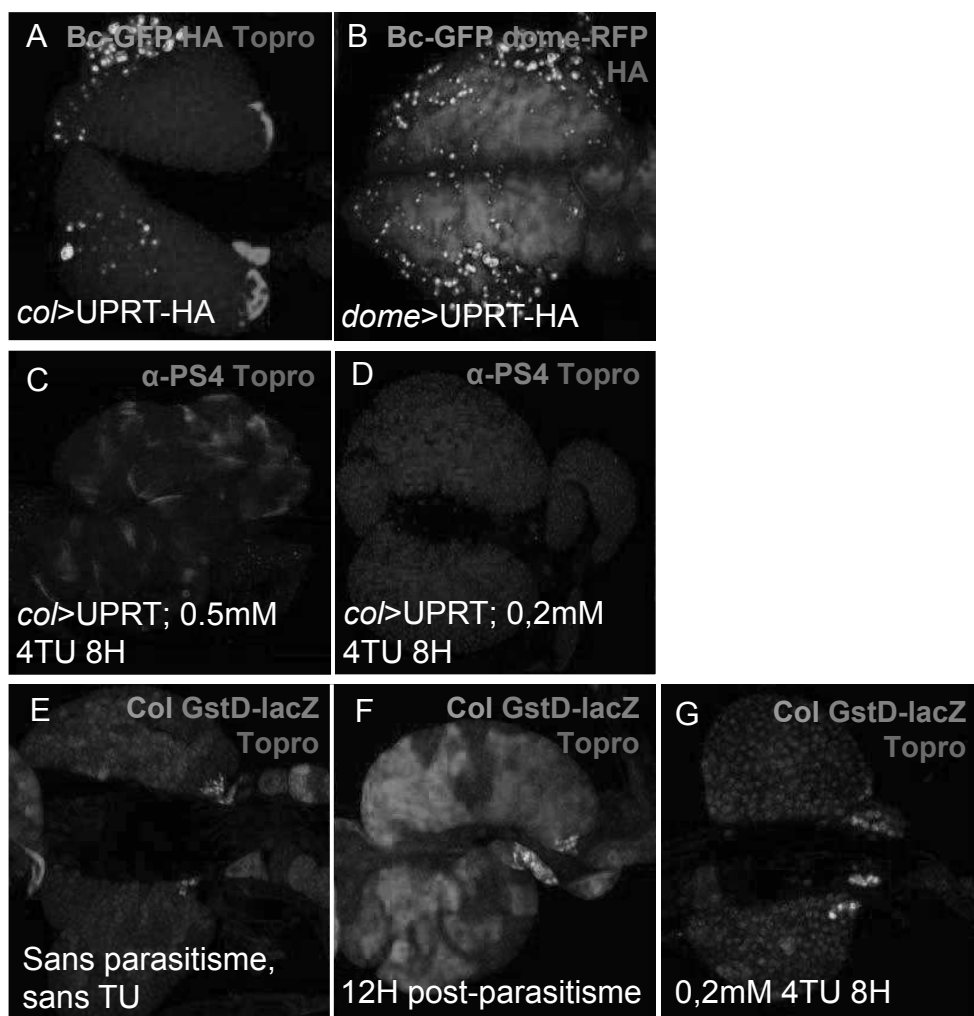


Figure 31 : Recherche de conditions de « TU-tagging » ne modifiant pas l'homéostasie de la GL

La surexpression d'une forme d'UPRT portant un tag HA (rouge en A; bleu en B) dans le PSC (*col>UPRT-HA*, A) ou dans la ZM (*dome>UPRT-HA*, B) ne modifie pas l'organisation de la GL en trois zones. L'ingestion par les larves d'une dose de 0,5mM de 4TU pendant 8H ou plus entraîne la différenciation dans la GL de lamellocytes (α -PS4, rouge) (C). Aucune différenciation de lamellocytes n'est par contre observée après ingestion par les larves d'une dose plus réduite de 0,2mM de 4TU (D). Après parasitisme, le rapporteur GstD-lacZ (rouge) est fortement exprimé dans la GL (F) par rapport à des larves non parasitées (E). Son expression dans la GL après ingestion de 4TU est comparable au niveau observé en l'absence de parasitisme (G). Le PSC est marqué par Col (vert; E-G). Les noyaux sont marqués par Topro.

C) Résultats

1) Trouver des conditions de « TU-tagging » ne modifiant pas l'homéostasie de la GL

Plusieurs facteurs sont susceptibles de générer un stress qui pourrait modifier l'homéostasie de la GL : la surexpression de l'enzyme UPRT, l'ingestion de 4TU, la manipulation des larves, les changements de température... J'ai donc réalisé des immunocolorations sur des GLs afin d'en visualiser les trois zones, et vérifié si leur organisation était modifiée. Dans un premier temps, j'ai testé si la surexpression de l'UPRT dans le PSC, ou la ZM utilisée ici comme contrôle, affectait l'organisation de la GL. Aucun changement notable de l'organisation des GLs n'a été observé, indiquant que l'expression de l'UPRT dans le PSC ou dans la ZM ne génère pas de stress (Figure 31-A à B). Afin de tester si l'ingestion de 4TU affecte l'homéostasie de la GL, nous avons nourri des larves avec du 4TU selon le protocole préalablement établi sur le cerveau (une dose de 0,5mM de 4TU pendant au moins 8H ; Miller et al., 2009) et avons analysé les conséquences sur la GL. Ces conditions conduisent à la différenciation de lamellocytes dans la GL (Figure 31-C). Ce type cellulaire n'est normalement pas produit en absence de parasitisme, et sa présence révèle donc un changement drastique de l'homéostasie de la GL. J'ai donc entrepris de mettre au point de nouvelles conditions, en modifiant le temps d'ingestion et/ou la concentration du 4TU dans le milieu nutritif. Je suis finalement parvenue à mettre au point un protocole (ingestion de 4TU à 0.2mM pendant 8H) qui n'entraîne pas l'apparition de lamellocytes dans la GL (Figure 31-D). Pour confirmer que ces conditions n'entraînent pas de stress oxydatif dans la GL, j'ai analysé l'expression du rapporteur GstD-lacZ, dont l'expression est fortement induite suite au parasitisme par des guêpes (Figure 31-E à F). Le niveau d'expression de GstD-lacZ dans la GL de larves nourries avec du 4TU est comparable à celui observé dans les larves contrôles non parasitées, indiquant que ces conditions ne perturbent pas l'homéostasie normale de la GL (Figure 31-G). Par la suite, j'ai systématiquement utilisé ces conditions.

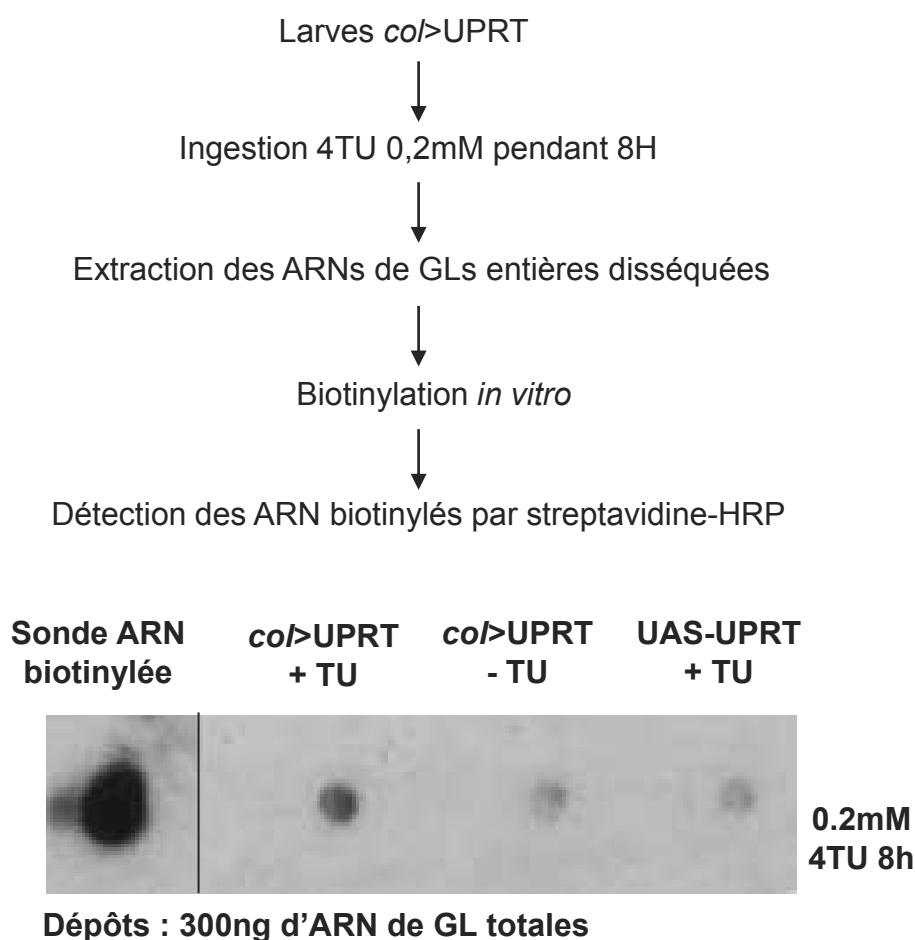


Figure 32 : Le protocole mis au point permet le marquage d'ARNs de la GL

Les ARN extraits de GL provenant de larves exprimant l'UPRT dans le PSC et nourries avec du TU (*co/*>UPRT +TU) génèrent un signal fort après biotinylation *in vitro* puis détection par streptavidine-HRP. Le signal détecté est beaucoup plus faible dans le cas de larves non nourries avec du 4TU (*co/*>UPRT –TU) ou de larves n'exprimant pas l'UPRT (UAS-UPRT +TU).

2) Vérifier de la présence d'ARNs marqués dans la GL

L'étape suivante était de tester la présence d'ARN étiquetés par le 4TU dans la GL. J'ai donc réalisé une extraction des ARNs à partir de GLs entières disséquées de larves *col>UPRT* nourries avec du 4TU, puis les ARNs ainsi obtenus ont été biotinylés *in vitro* et déposés sur une membrane de nylon. La présence d'ARNs marqués au 4TU a ensuite été révélée par dot-blot basé sur la reconnaissance de la biotine par la streptavidine couplée à l'enzyme HRP (Figure 32). J'ai déposé sur la membrane de nylon une sonde ARN biotinylée, contrôle positif de la technique de dot-blot, ainsi que 300ng d'ARNs de GLs provenant de larves *col>UPRT*, ou UAS-UPRT (sans pilote d'expression), nourries ou non avec du 4TU (Figure 32). Comme attendu, la sonde biotinylée donne un fort signal, validant l'utilisation de ce type de dot-blot pour la détection d'ARN biotinylés. Les échantillons provenant des larves *col>UPRT* nourries avec du 4TU (*col>UPRT* +TU) donnent également un signal fort en dot-blot, confirmant l'incorporation de 4TU dans les ARNs de la GL. Par contre les ARNs de larves *col>UPRT* non nourries avec du TU (*col>UPRT* -TU) ne génèrent quasiment aucun signal, ce qui indique que la biotinylation *in vitro* est spécifique des résidus 4TU. Enfin, un signal faible est détecté dans les échantillons provenant de larves UAS-UPRT sans pilote nourries avec du 4TU (UAS-UPRT +TU). Ces résultats indiquent que l'incorporation de 4TU dans les ARNs est plus efficace en présence d'UPRT. L'ensemble de ces résultats montre que le protocole établi permet bien l'obtention d'ARNs étiquetés 4TU à partir de GLs.

3) Tester la spécificité du marquage des ARNs

L'étape suivante a été de vérifier que les ARNs isolés à la fin du protocole de « TU-tagging » sont bien ceux attendus. Pour cela deux points ont été analysés :

- La spécificité de rétention des billes streptavidine, afin de vérifier que les billes ne retiennent que des ARNs biotinylés
- La spécificité du marquage des ARNs du PSC et de leur purification, c'est-à-dire établir si le « TU-tagging » permet un enrichissement des ARNs du PSC par rapport aux ARNs provenant du reste de la GL.

a) Spécificité de la rétention sur des billes

L'une des difficultés majeures de l'approche de « TU-tagging » sur la GL est la manipulation de très faibles quantités d'ARN. La GL est en effet un organe de très petite taille (environ 3000 cellules par lobe en milieu de troisième stade larvaire), dont le PSC ne représente à peine qu'1% des cellules. Ainsi, obtenir une quantité suffisante d'ARNs pour pouvoir faire des tests de mise au point du protocole représente un véritable défi. A titre d'exemple, chaque test de mise au point pour les expériences présentées dans la partie 2) a nécessité la dissection d'environ une centaine de GLs par échantillon. Pour contourner ce problème j'ai testé la spécificité de rétention des billes sur un autre organe de la larve de drosophile, le cerveau, plus gros et donc plus facile et rapide à disséquer.

Pour tester la spécificité de rétention des billes, j'ai cherché à savoir si des ARNs marqués par « TU-tagging » sont préférentiellement retenus par les billes streptavidine, par rapport à des ARNs non marqués. Pour cela, j'ai marqué les ARNs de cerveaux en nourrissant des larves exprimant l'UPRT sous le contrôle du pilote *elav-gal4*, exprimé dans tous les neurones, avec du 4TU à 0,5mM pendant 16H. Les ARNs ont été extraits de cerveaux disséqués au stade mL3 puis ont été biotinylés *in vitro*. Le pilote *elav-gal4* étant exprimé dans tous les neurones, une grande majorité des ARNs de cerveau sont potentiellement étiquetés par le 4TU. A cette préparation d'ARNs de cerveau j'ai ajouté un ARN exogène synthétisé *in vitro* en absence de 4TU. L'ARN exogène choisi code pour la β -tubuline (β tub) d'une autre espèce de

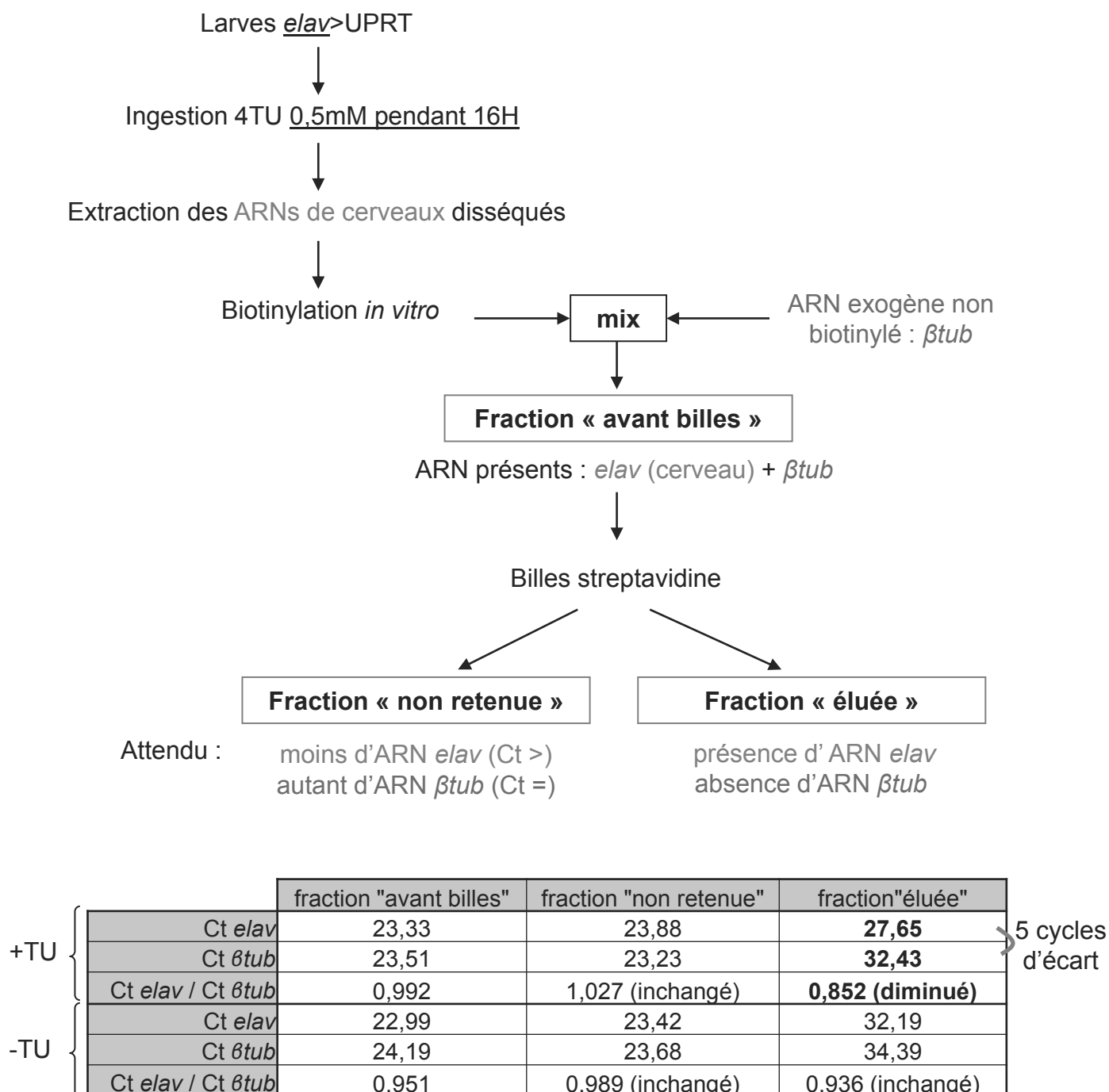
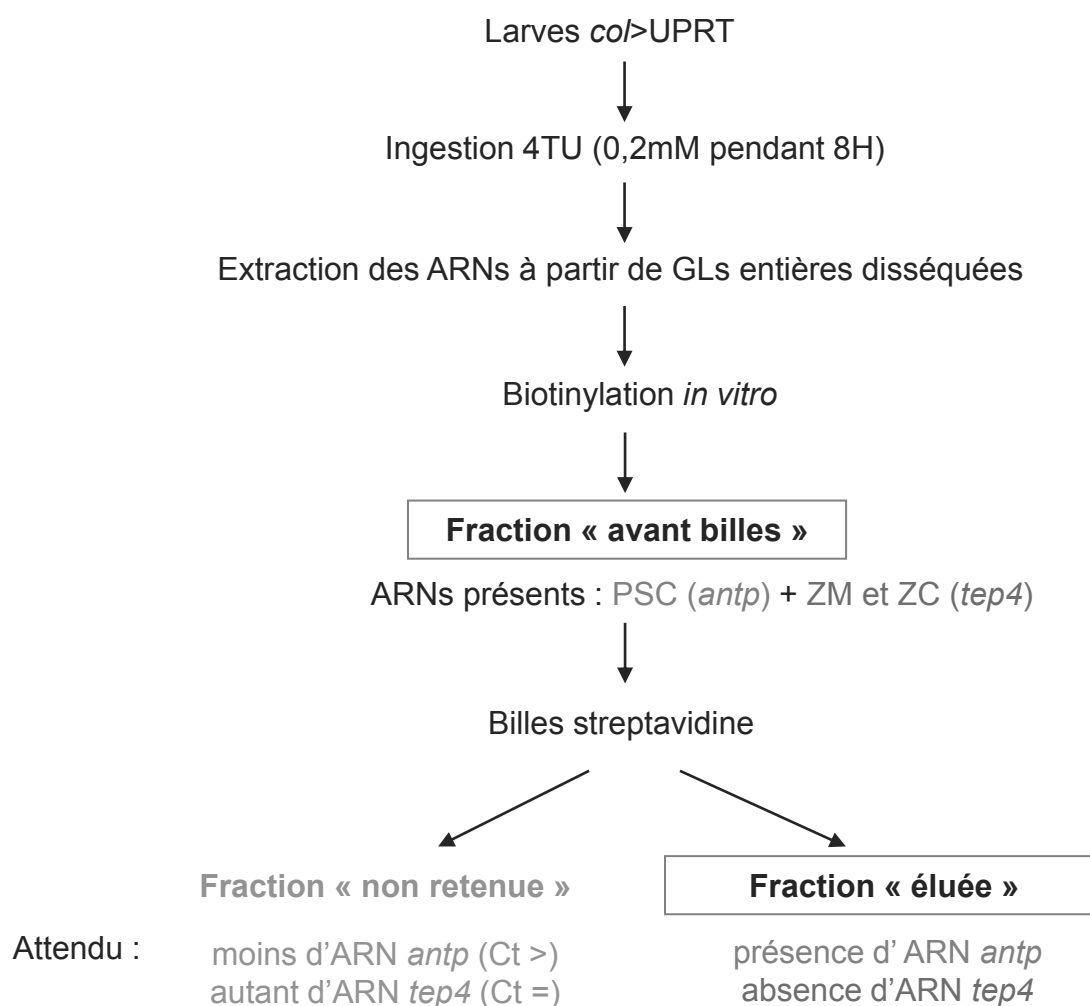


Figure 33 : Test de spécificité de rétention des ARNs par les billes strepavidine

L'expérience présentée ici consiste à mélanger deux populations d'ARNs, l'une provenant de cerveaux de larves *elav*>UPRT nourries ou non avec du 4TU puis biotinylés *in vitro* et l'autre étant l'ARN exogène *βtub* de *Drosophila virilis*, ne contenant ni 4TU ni biotine; puis de mesurer la quantité relative des ARNs *elav* et *βtub* dans les fractions « avant billes », « non retenue » et « éluee ». Pour les larves +TU comme -TU, les ARN *elav* et *βtub* sont détectés au même cycle de PCR dans la fraction « avant billes ». Les ARNs *elav* et *βtub* sont aussi détectés au même cycle dans la fraction « non retenue », pour les larves +TU et -TU. Dans la fraction éluee, l'ARN *elav* est détecté 5 cycles plus tôt que l'ARN *βtub* pour les échantillons +TU, indiquant un enrichissement en ARNs du cerveau par rapport à l'ARN non marqué *βtub*. Pour les échantillons -TU, l'écart entre les cycles PCR pour la détection des ARNs *elav* et *βtub* est fortement réduit dans la fraction « éluee ».

drosophile, *Drosophila virilis*, et n'est donc pas présent dans les échantillons préparés à partir de cerveaux de *Drosophila melanogaster*. Le mélange de ces deux préparations d'ARNs a été déposé sur les billes couplées à la streptavidine (Figure 33). Par RT-PCR quantitative, j'ai ensuite comparé la quantité relative d'un ARN spécifiquement exprimé dans le cerveau, *elav*, et de l'ARN *βtub* dans trois fractions différentes : la fraction « avant billes », qui correspond au mélange d'ARNs avant qu'il ne soit déposé sur les billes, la fraction « non retenue », qui correspond aux ARNs qui ont été mis en contact avec les billes mais n'y sont pas restés accrochés, et la fraction « éluee », qui contient les ARNs ayant été retenus sur les billes. Les proportions relatives des ARNs *elav* et *βtub* dans ces trois fractions permettent de savoir si comparativement à l'ARN exogène *βtub*, l'ARN *elav* est préférentiellement retenu sur les billes.

Dans la fraction « avant billes », on détecte comme attendu à la fois la présence d'ARN *elav* et d'ARN *βtub*, aussi bien pour les échantillons provenant de larves nourries avec du 4TU (+TU) que de larves contrôles sans 4TU (-TU). Après mise au point de cette expérience, j'ai adapté la quantité de *βtub* à ajouter aux échantillons pour que les signaux RT-qPCR d'*elav* et de *βtub* soient détectés au même cycle de qPCR (Ct : indiqués sur la figure), donnant ainsi un ratio Ct *elav* / Ct *βtub* d'environ 1 avant le passage sur les billes. Dans la fraction « non retenue », les cycles qPCR auxquels sont détectés les ARNs *elav* et *βtub* ne sont pas modifiés par rapport à la fraction « avant billes », et le ratio Ct *elav* / Ct *βtub* reste environ égal à 1 ; que ce soit pour les échantillons +TU ou pour les échantillons -TU. Ces résultats indiquent que très peu d'ARN *elav* est en fait marqué et/ou retenu par les billes streptavidine après traitement 4TU. Dans la fraction « éluee », le signal « *elav* » est détecté 5 cycles plus tôt que le signal « *βtub* » pour les échantillons +TU, entraînant une diminution du ratio Ct *elav* / Ct *βtub*. Cette variation montre que l'ARN *elav* est enrichi dans cette fraction par rapport à l'ARN *βtub*, et a donc été plus fortement retenu sur les billes. L'ARN *βtub* reste néanmoins détectable, indiquant que des ARNs non marqués par le 4TU ou la biotine peuvent également se fixer de façon non spécifique sur les billes. Pour les échantillons -TU, dans la fraction « éluee » l'écart entre les cycles qPCR auxquels sont détectés les signaux « *elav* » et « *βtub* » est fortement réduit comparé à celui observé dans la fraction « éluee » des échantillons +TU ; le ratio Ct *elav* / Ct *βtub* restant environ égal à 1. Ceci indique que l'enrichissement en



		fraction "avant billes"	fraction "éluee"
+TU {	Ct <i>antp</i>	30,293	32,313 (+2,02 cycles)
	Ct <i>tep4</i>	20,99	23,563 (+2,573 cycles)
-TU {	Ct <i>antp</i>	30,84	35,66 (+4,82 cycles)
	Ct <i>tep4</i>	19,043	24,296 (+4,687 cycles)

Figure 34 : La technique de « TU-tagging » ne permet pas un enrichissement satisfaisant en ARNs du PSC

Dans la fraction « avant billes », l'ARN *antp* comme l'ARN *tep4* est détecté au même cycle de qPCR pour les échantillons +TU et –TU. Pour l'échantillon +TU, l'ARN *antp* est détecté 2 cycles plus tard dans la fraction « éluee » que dans la fraction « avant billes », tandis que l'ARN *tep4* est détecté 2,5 cycles plus tard. Cet écart traduit un léger enrichissement en ARN *antp* par rapport à *tep4*. Pour l'échantillon –TU, les ARN *antp* et *tep4* sont tous les deux détectés environ 4,7 cycles plus tard dans la fraction « éluee » que dans la fraction « avant billes », indiquant que l'enrichissement observé précédemment est bien dû à l'incorporation de 4TU dans les ARNs de la GL.

ARNs de cerveaux observé dans les échantillons +TU est bien dû à la rétention spécifique d'ARNs marqués par les billes streptavidine. Ici encore, aussi bien les ARNs *elav* que *βtub* sont détectés dans la fraction « éluee », montrant une fixation non spécifique d'ARNs non marqués sur les billes streptavidine. Ces expériences ont donc permis d'établir que les billes couplées à la streptavidine permettent bien d'enrichir la fraction d'ARNs marqués dans une population globale d'ARNs, mais ces billes fixent également une faible proportion d'ARNs non marqués, qui par la suite génèrent un bruit de fond expérimental.

b) Spécificité du « TU-tagging » des ARNs du PSC

J'ai enfin testé si le protocole mis au point sur la GL permet l'obtention d'une population d'ARNs fortement enrichie en ARNs du PSC. Pour cela j'ai comparé par RT-qPCR la quantité relative de deux ARNs : l'ARN *antennapedia* (*antp*), exprimé dans la GL uniquement au niveau du PSC, et l'ARN *thioester-containing protein 4* (*tep4*), exprimé dans la ZM et absent du PSC. La comparaison des quantités relatives de ces deux ARNs dans les fractions « avant billes » et « éluee » permet d'avoir une première idée de l'enrichissement en ARN du PSC obtenu après TU-tagging. Cette expérience s'est révélée difficile à cause d'un problème majeur : la quantité d'ARNs éluee à la fin du protocole est extrêmement faible. Dans nos premiers tests, une RT-qPCR réalisée sur la totalité des ARN élués ne permettait même pas la détection de l'ARN *antp*, à partir de larves *col>UPRT* nourries ou non avec du 4TU. En augmentant le nombre de GL disséquées, j'ai finalement réussi à détecter un signal après RT-qPCR sur la totalité de l'ARN élué. Les RT-qPCR réalisées sur la fraction « éluee » ont donc été réalisées à partir de la totalité des ARNs élués, tandis que celles réalisées sur la fraction « avant billes » ont été faites à partir de 100ng d'ARNs. Les ARNs *antp* et *tep4* sont tous deux détectés au même cycle dans les fractions « avant billes » des échantillons +TU et -TU, montrant la reproductibilité des expériences de RT-qPCR (Figure 34). Pour l'échantillon +TU, l'ARN *tep4* est détecté 2,5 cycles plus tard dans la fraction « éluee » que dans la fraction « avant billes », tandis que l'ARN *antp* est détecté seulement 2 cycles plus tard. Cette différence traduit un léger enrichissement en ARN du PSC à la fin du protocole de « TU-tagging ». Pour l'échantillon -TU, l'ARN *antp* et l'ARN *tep4* sont

tous deux détectés environ 4,7 cycles plus tard dans la fraction « éluee » que dans la fraction « avant billes ». Ceci indique que l'enrichissement en ARNs du PSC est perdu en absence de 4TU (Figure 34). Néanmoins plusieurs points sont à noter :

- Dans les échantillons +TU et -TU, la présence de l'ARN *tep4* est toujours détectable dans la fraction « éluee », ce qui traduit une fixation non spécifique d'ARNs non marqués sur les billes streptavidine. Cette donnée est cohérente avec les résultats préalablement obtenus sur le cerveau (cf a)

- Les deux ARNs, et pas uniquement l'ARN *antp*, sont détectés beaucoup plus tôt dans la fraction « éluee » de l'échantillon +TU que dans la fraction « éluee » de l'échantillon contrôle -TU. Cette expérience a été réalisée plusieurs fois et la même tendance est observée. Ce résultat pourrait être dû à une incorporation non spécifique de 4TU dans les ARNs en absence d'UPRT, qui pourrait donc générer un marquage de tous les ARNs de la GL. Ainsi, une quantité plus grande d'ARNs est obtenue après élution dans le cas de larves nourries avec du 4TU, mais ces ARNs ne sont pas exclusivement des ARNs du PSC.

D) Conclusion

L'accumulation de difficultés techniques a conduit à l'abandon de cette approche, qui de prometteuse s'est progressivement révélée irréaliste. La plus grande difficulté à gérer est la quantité de matériel biologique nécessaire au « TU-tagging », qui est peu compatible avec la taille de la GL, dont la dissection requiert un temps et un savoir-faire technique important. Il est à noter que tous les tests présentés dans les parties précédentes ont été réalisés à partir d'échantillons de larves de milieu de troisième stade larvaire, où la GL est composée d'environ 3000 cellules par lobes, dont une moyenne de 30 cellules par PSC. Notre but était de comparer le transcriptome du PSC en absence d'infection et 6H après parasitisme, soit à un stade larvaire plus précoce, en début de troisième stade larvaire, où la GL est par définition encore plus petite et par conséquent la quantité de matériel obtenue encore plus réduite. Enfin, il était nécessaire de combiner le protocole de « TU-tagging » avec le parasitisme par les guêpes, ce qui constitue une difficulté supplémentaire.

Lors de tests de mise au point, j'ai pu observer que l'ingestion de 4TU à 0,5mM par les larves entraîne la production de lamellocytes dans la GL. Cette observation inattendue nous a amené à conclure que la présence de 4TU est perçue comme un stress, et perturbe l'homéostasie de l'organe hématopoïétique. En 2013, Lee et al. ont montré que lors d'une infection orale de drosophiles adultes par des bactéries pathogènes, de l'uracile d'origine bactérienne est détecté par les cellules du système digestif de la drosophile, qui vont alors produire des ROS grâce à l'enzyme NADPH Dual Oxidase (DUOX) (Lee et al., 2013). Cette production de ROS par les cellules du système digestif fait intervenir la voie de signalisation Hh (Lee et al., 2015). Dans la GL, le niveau de ROS dans la ZM est connu pour intervenir dans le maintien de l'homéostasie de la GL (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009), et une augmentation du niveau de ROS dans le PSC est nécessaire à la réponse au parasitisme (Sinenko et al., 2012) ; cf introduction III-C-4). Il est donc possible que le 4TU dans la GL ait un effet similaire à l'uracile bactérien dans le tube digestif, et entraîne une production de ROS, pouvant conduire à la différenciation de lamellocytes. L'effet toxique de l'uracile / du 4TU est donc un frein considérable à l'utilisation de l'approche de « TU-tagging » chez la drosophile, en particulier sur des cellules impliquées dans l'immunité.

Un autre des problèmes rencontrés était la faible efficacité de l'incorporation de 4TU dans les ARNs : à la fin de chaque expérience, y compris pour celles réalisées avec le protocole originalement publié sur le cerveau, la très grande majorité des ARNs qui devaient être marqués puis retenus était en fait détectée dans la fraction « non retenue ». Une hypothèse pour expliquer cela est la température utilisée. L'UPRT est une enzyme provenant de *Toxoplasma gondii* et qui fonctionne de façon optimale à 37°C. Cette température n'étant pas compatible avec la viabilité des larves, elles ont été placées à 29°C lors de l'ingestion de 4TU. Cette température ne permet peut-être pas un fonctionnement efficace de l'UPRT. Ce défaut aurait pu être contourné en augmentant la quantité de 4TU dans le but d'améliorer son taux d'incorporation. Cependant, ceci n'est pas possible dans le cas de la GL car cela modifie l'homéostasie de l'organe.

Enfin, la difficulté majeure qui a conduit à l'abandon de cette approche est le manque de spécificité de cette technique, qui ne permet qu'un enrichissement très faible des ARNs d'intérêt. Chacune des étapes du protocole (l'incorporation de 4TU dans les ARNs, leur biotinylation *in vitro*, la rétention des ARNs sur les billes...) génère un bruit de fond expérimental, qui s'accumule jusqu'à devenir trop important pour pouvoir réaliser des analyses transcriptomiques différentielles. La technique de marquage des ARNs par « TU-tagging » présente un autre biais, dont les auteurs de la publication originale de 2009 discutent (Miller et al., 2009). En effet, le marquage des ARNs dépend de la quantité de nucléotides uracile qu'ils contiennent. On ne peut pas exclure que certains ARNs dont la séquence est pauvre en uracile ne seront pas marqués, tandis que d'autres dont la séquence est riche en uracile seront artificiellement enrichis.

Néanmoins, la mise en œuvre de cette méthode m'a appris à développer une méthodologie rigoureuse, basée sur de nombreuses approches différentes. Même en l'absence d'une « fin heureuse » pour l'approche « TU-tagging », j'en retire un savoir-faire technique ainsi qu'une expérience professionnelle importants.

IV. Résultats complémentaires

A) Contrôle de la « niche hématopoïétique » de la drosophile par le système vasculaire : rôle de la signalisation Slit/Robo

1) Résumé

Le contrôle du nombre et de la fonction des cellules du PSC est l'une des questions phares de notre équipe. Avant mon arrivée dans le laboratoire, des analyses transcriptomiques avaient été réalisées à partir de GLs entières disséquées. Ces analyses ont permis d'identifier *robo2* comme un gène potentiellement exprimé dans le PSC. L'étude du rôle de Robo2 dans le PSC a donc été entreprise, et j'ai pu y prendre part ; sur le plan technique en réalisant des RT-PCR quantitatives et par la construction de lignées de drosophiles, et sur le plan théorique par de nombreuses discussions critiques tout au long du projet et au cours de la rédaction de l'article.

Nous avons pu montrer que les récepteurs Robo 1, 2 et 3 sont exprimés dans le PSC, avec une expression plus forte pour Robo2. Les protéines Robo sont les récepteurs de la voie de signalisation Slit/Robo, qui intervient dans la guidance axonale chez les mammifères et la drosophile (Ballard and Hinck, 2012), dans l'adhérence cellulaire lors de la formation du tube cardiaque chez la drosophile (Helenius and Beitel, 2008); ou encore dans le contrôle de la prolifération lors de la formation des glandes mammaires chez les mammifères (Macias et al., 2011). L'inhibition des récepteurs Robo dans le PSC conduit à une augmentation du nombre de cellules du PSC, ainsi qu'à une perte de leur cohésion. Ces modifications de la structure du PSC ont pour conséquence un changement de l'équilibre entre progéniteurs et cellules différenciées dans la GL. Une analyse détaillée des mécanismes impliqués a permis d'établir que l'activité de la voie Slit/Robo contrôle la prolifération et la cohésion des cellules du PSC en régulant l'activité de la voie Dpp et de la petite GTPase cdc42, respectivement. De plus, la voie Slit/Robo interfère avec la fonction de la DE-Cadhérine dans le PSC, conduisant à un défaut de prolifération et de cohésion de ces cellules. De façon intéressante, l'expression de Slit, ligand de la voie, est requise dans le tube cardiaque, système vasculaire de la drosophile. Ces travaux mettent en évidence l'existence d'une communication inter-organe entre le système vasculaire et le PSC, permettant le contrôle du nombre et de la cohésion

des cellules du PSC. Ces résultats posent la question de la conservation d'une communication entre les niches endostéale et vasculaire dans la moëlle osseuse des mammifères adultes, ainsi que celle du rôle de la signalisation Slit/Robo dans ce processus.

2) Article

Vascular control of the *Drosophila* hematopoietic niche: role of Slit/Robo signaling

*Ismaël Morin-Poulard, Isabelle Louradour, Anurag Sharma, Nathalie Vanzo, Alain Vincent and Michèle Crozatier**

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547 CNRS/Université Toulouse III and
Fédération de Recherche de Biologie de Toulouse, 118 route de Narbonne 31062
Toulouse cedex 9 France

*Author for correspondence (michele.crozatier-borde@univ-tlse3.fr)
Tel: 00 33 5 61 55 82 89; Fax: 00 33 5 61 55 65 07

Summary/Introduction

Self-renewal and differentiation of mammalian Hematopoietic Stem Cells (HSCs) are controlled by a specialized microenvironment called “niche”. In the bone marrow, HSCs receive signals from both the endosteal and vascular niche. However, whether crosstalk exists between these two components has not been investigated. The Posterior Signalling Centre (PSC) of the larval *Drosophila* hematopoietic organ, the lymph gland (LG), plays a role equivalent to a niche, in regulating the balance between progenitor and differentiated blood cell. Here we report that the *Drosophila* vascular system contributes to LG cell homeostasis by regulating PSC function. Vascular cells produce Slit that activates Robo receptors in the PSC. Slit/Robo activation controls proliferation and clustering of PSC cells by regulating BMP/Dpp signalling, and small GTPase and DE- Cadherin, respectively. These findings reveal that signals from the vascular system control PSC morphology. Whether cross-regulation between endosteal and vascular niches exists in mammals is now an open question.

The *Drosophila* larval hematopoietic organ, called the lymph gland (LG), develops in contact with the aorta, the anterior part of the cardiac tube, which corresponds to the *Drosophila* cardio-vascular system. Blood cells/hemocytes differentiate in the cortex of the LG, in a so-called cortical zone (CZ), from a pool of multipotent progenitors called prohemocytes present in the medullary zone (MZ) [1]. PSC/niche cells are clustered at the posterior end of the LG [2-4]. Several signalling pathways that control the LG the LG homeostasis, i.e. the balance between LG multipotent hemocyte progenitors and differentiated blood cells have been identified, among which Hedgehog (Hh) signalling from PSC to MZ [5-16]. Like the niche in mammals, PSC size must be controlled to maintain normal LG hematopoietic homeostasis [2, 3, 5, 14, 15, 17-21]. In PSC cells, Bone Morphogenetic Protein/ Decapentaplegic (BMP/Dpp) signalling activity controls niche size by repressing the proto-oncogene *dmyc* [19]. Activation of BMP signalling in the PSC requires the expression of the Dally-like heparan sulfate proteoglycan (HSPG). Nevertheless our knowledge of the molecular control of PSC morphology, i.e. cell numbers and clustering, and its activity,

remains fragmentary. Our unpublished LG transcriptome analyses identify the Robo2 receptor as being expressed in the PSC, in addition to Dlp [19], thereby raising the question of what role Slit/Robo signalling plays in these cells.

Here we show that Slit/Robo signalling contributes to maintaining the size, the morphology and the function of the *Drosophila* hematopoietic niche. Robos receptors are required in PSC cells to control both the proliferation rate and clustering of these cells. The ligand Slit is expressed in the cardiac tube, i.e. the vascular system, and signals to Robos in the PSC. Our data establish that inter-organ communication between the cardiac tube and the PSC is required to preserve the morphology and function of the PSC.

Results

Abnormal PSC morphology in *robo* mutants

Slit/Robo signalling is a key regulator of axon guidance, cell migration, adhesion and proliferation both in vertebrates and invertebrates [22-24]. Three Robo receptors and one Slit ligand are encoded in the *Drosophila* genome [22, 25, 26]. Examining the expression of Robo receptors by immunostaining with anti-Robo antibodies or by looking at the expression of HA-tagged endogenous alleles [27], showed Robo2 expression in PSC cells, crystal cells and in the cardiac tube (Fig 1a and S1c), whereas Robo1 was detected in the MZ, the cardiac tube and at low levels in the PSC (Fig S1a). Barely detectable levels of Robo 3 were present in PSC cells (Fig S1e). Thus, all three *robos* were expressed in the PSC with *robo2* at the highest level. To study the role of Robos in PSC cells during larval development, we used a PSC specific Gal4 driver (*col-Gal4*) to express dsRNA against either *robo2* (*robo2 KD*) or all three *robos* termed (*robo KD*). Decreased *robo2* expression in the PSC resulted in an increased PSC cell number (Fig 1e, g). Furthermore, whereas PSC cells were clustered posteriorly in wild-type LGs (Fig 1a and Mov S1), the posterior clustering was lost in *robo2 KD* PSC (Fig 1e, h). A comparable PSC defect was observed in a heterozygous context where one copy of *robo2* was missing (Fig 1b-d). A complete rescue of PSC size and clustering was obtained when Robo2-HA was expressed in the PSC of *robo2 KD* larvae (Fig S1g-i),

indicating that Robo2 was required in PSC cells to control their number and clustering. Reducing the expression of all three *robos* in the PSC (*robo KD*) aggravated PSC cell numbers and clustering defects (Fig 1f-h). Indeed, small clusters or individual PSC cells spread anteriorly along the surface of the LG (Fig 1f and Mov S2). A similar phenotype was observed when using *Antp*-Gal4 as another PSC driver, confirming the requirement of Robo receptors in the PSC to control its morphology (Fig S1m, n). Down regulating all three *robos* led to a decrease of all three Robos in PSC cells (Fig S1b, d, f) and generated a stronger PSC defect (Fig 1f-h) compared to reducing *robo2* alone (Fig 1e, g-h), indicating that *robo 1* and/or *3* might contribute to PSC morphology. However, no PSC defect was observed when dsRNA against *robo1* or *robo3* alone was expressed in PSC cells (Fig S1j-l). Altogether, these data indicated that *robo2* was the main Robo receptor controlling PSC morphology and that *robo1* and/or *3* are secondary contributors.

To determine if PSC defects observed in *robo KD* PSC were linked to PSC cell mis-specification and/or dispersion, we examined the morphology of the PSC at different larval stages. Defects in *robo KD* PSCs were not observed in L1 larvae but were detected in L2 larvae and amplified in L3, suggesting that Robos were required throughout larval development (Fig 2a-f). To go one step further, we used the temporal and regional gene expression targeting system (TARGET; Gal80ts/Gal4 expression system) [28] to reduce *robos* in PSC cells at different time points during larval development. Loss of *robos* at either L1 or L2 stages led to PSC morphology defects, confirming the continuous requirement for *robos* (Fig 2g-j). To verify that scattered *robo KD* PSC cells were derived from PSC and not de novo re-specified MZ cells, we turned to lineage tracing to mark all cells issued from the MZ, using the G-TRACE method with the *dome-Gal4* MZ specific driver [2, 29]. We found no PSC cells, as labelled by *Antp*, expressing GFP in either wild-type or *robo2* mutant (Fig 2k-n). This established that the scattered PSC cells observed in *robo2* mutant LGs all originated from the PSC lineage. Altogether, these data indicated that during larval development *robo KD* PSC cells concomitantly over-proliferate and disperse.

The control of PSC size was previously shown to be essential for LG hemocyte homeostasis [3, 5, 19, 21]. We therefore looked at hemocytes differentiation in *col>robo KD* conditions. Crystal cells and plasmotocytes, which are the two types of differentiated hemocytes found under normal conditions, were identified by proPO and P1 antibody staining, respectively. Compared to wild-type, fewer crystal cells and plasmotocytes were detected in *robo KD* LGs, confirming the relevance of the PSC size for normal LG hematopoiesis (Fig 1i-n). Hh expression in the PSC was shown to be required to maintain progenitors in the MZ and to block their differentiation [3]. As in wt, the Hh-GFP [15] transgene, a reporter of Hh expression in the PSC, was expressed in all PSC cells in a *robo KD* context (Fig S2). This suggests that in *robo KD* mutants, the increased PSC size led to an increased production of Hh signal, among others, that acted non-cell-autonomously and affected the LG homeostasis [3].

Slit expressed in the cardiac tube is required to control PSC morphology

Slit is the single known *Drosophila* Robo ligand. High levels of Slit were detected in the cardiac tube (CT) and low levels in PSC cells (Fig 3a-b'). Expression of *slit* dsRNA in the CT using the *handΔ*-Gal4 driver, resulted in barely detectable Slit levels in both the CT and the LG (Fig S4a-b'), indicating that the source of Slit was the CT and Slit in the PSC resulted from diffusion from the CT. In support of this conclusion, reducing *slit* expression (*pcol>slit KD*) in PSC cells (Fig S4g, h) had no effect on PSC morphology, while reduction of *slit* expression specifically in the CT using either *HandΔ*-gal4 or another CT driver NP1029-gal4 [30], led to both increased numbers and defective clustering of PSC cells (Fig 3c-f and S4c-d). PSC morphology defects observed in *handΔ>slit KD* LGs were rescued by co-expressing an active form of Slit (Slit-N) (Fig 3g-i, [31]), further confirming that Slit from the CT is required to control PSC morphology. A similar PSC phenotype was observed when one copy of *slit* was missing (Fig 3j-l). *Slit ds RNA* experiments were performed in larvae once the CT had formed to avoid any CT morphological defects due to Slit/Robo signalling requirement for embryonic CT development [32-36](Fig S4 e-f). To determine whether an ectopic source of Slit might affect the PSC we expressed Slit-N in the PSC, or MZ or CT cells. No effect on PSC morphology was observed, indicating that Slit from the CT is sufficient to activate Robo

signalling in PSC cells (Fig S3g-l). Consistent with the increased PSC cell numbers observed in *slit* KD LGs, fewer crystal cells were present in the LGs when *slit* expression was downregulated in the CT (Fig 3m-o). Altogether, these data indicate that down-regulating *slit* in the CT caused a phenotype similar to downregulating *robos* in the PSC. These data demonstrate that Slit/Robo mediated communication between the vascular system and the PSC to control PSC cell number, clustering and ultimately function.

Robo signalling controls PSC cell proliferation via the BMP signalling pathway and the accumulation of the Dally-like Heparan Sulfate Proteoglycan protein

To determine whether cell proliferation was affected in *robo* KD, we analysed the expression of phospho-histone H3 (H3P), a M-phase marker, and calculated the mitotic index in the PSC and MZ+CZ (Fig 4a-c). In agreement with the increased PSC size, the number of mitotic cells was statistically higher in the PSC of *robo* KD larvae than in wild-type. No change in the mitotic index in the other LG cells indicates that Robo receptors specifically modulated cell proliferation in the PSC without affecting the proliferation of other LG cells. Since proliferation of PSC cells is controlled by expression levels of the proto-oncogene *dmyc* [19, 21], we questioned whether increased proliferation in the *robo* KD PSC was linked to *dmyc* regulation. In *robo* KD PSC, *dmyc* expression in the PSC was higher than wild-type (Fig 4d-f). We therefore asked whether decreasing *dmyc* could rescue *robo* KD PSC defects. Simultaneous reduction of *dmyc* and *robo* (*col>robo* KD>*dmyc* KD) (Fig 4h, i) restored wt PSC cells numbers, but did not rescue clustering defects (Fig 4h, p), indicating that *robos* control PSC cell proliferation via *dmyc* regulation and clustering by other mechanisms. *dmyc* transcription in the PSC is under positive and negative regulation by Wnt/Wg and BMP/Dpp signalling, respectively (Fig 7 and [19]). We therefore wished to determine whether Wnt/Wg signalling was affected. D-frizzled 3 (Dfz3) is a target of the Wnt/Wg pathway [37], and the transgene Dfz3-RFP is a reporter of Wnt/Wg pathway activity in the PSC (Fig S6). Reduction of *robo* function in the PSC did not affect Dfz3-RFP expression, indicating that Wnt/Wg signalling was not impaired (Fig S6). Furthermore, to determine whether BMP/Dpp signalling was affected, we analysed the expression of *dad*-GFP, a reporter of the pathway [19]. Reduction of *robo*

function in the PSC led to a decrease in dad-GFP expression. This effect, however, was not uniform but varied from cell to cell independently of their position (Fig 4j-k and S5a). This stochastic reduction of dad-GFP expression indicated that Robo signalling was required for robust BMP activity in all PSC cells. Activation of BMP/Dpp signalling required the Dally-like (Dlp) Heparan Sulfate Proteoglycan in PSC cells [19]. A strong decrease in Dlp level was observed in *robo KD* PSC (Fig 4l-m' and S5b). To define whether Robos regulate *dlp* levels at transcription or protein levels, we analysed both the expression of a GFP reporter under the control of the *dlp* promoter (*dlp-GFP*) and *dlp* by qRT-PCR. In *robo KD* LGs, *dlp-GFP* expression was similar to wild-type (Fig 4q, r) and no change in *dlp* RNA levels could be detected (Fig S5c). This suggests that Robo signalling does not control *dlp* transcription but rather Dlp protein level in PSC cells. We then asked whether restoring *dlp* could rescue *robo KD* PSC defects. Overexpression of *dlp* in *robo KD* PSC (*col>robo KD>dlp*) did indeed result in a normal number of PSC cells but did not rescue their clustering (Fig 4i, n-p), indicating that Robos regulate PSC cell proliferation by controlling Dlp accumulation. Altogether, these data establish that Robo signalling regulates PSC cell number by controlling BMP/Dpp signalling in PSC cells via the regulation of Dlp accumulation and in turn *dmyc* expression.

Robo signalling controls PSC cell numbers and their clustering via DE-cadherin

The next step was to address how Robo signalling could control PSC cell clustering. Robo signalling inhibits cadherin-mediated adhesion in various cell types both in vertebrates and in *Drosophila* [32, 34, 38]. DE-cadherin has been reported to be expressed in the MZ of L3 larval LGs [3, 39]. To examine its expression in the PSC during larval development, we used a GFP tagged DE-Cadherin (DE-CadGFP) expressed under its endogenous promoter [40]. In wild-type LGs, DE-CadGFP was detected in the PSC at the L2 stage. Barely detectable levels were observed in L2 *robo KD* PSCs, compared to wild-type, indicating that Robos controlled DE-CadGFP accumulation in PSC cells (Fig 5a-b'). To test whether DE-cadherin is required for PSC cell clustering, we expressed *DE-cadherin dsRNA* in PSC cells. We observed that 33% of the LGs (n=44 lobes) exhibited a defect in PSC cell clustering (Fig 5f). Unexpectedly, an

increased number of PSC cells was also found (Fig 5c-e), indicating that DE-cadherin was required to control both PSC cell numbers and clustering. We then asked whether the increased proliferation of PSC cells observed upon DE-cadherin removal from the PSC was linked to impairment of BMP/Dpp signalling. For this we examined *dad*-GFP expression and Dlp accumulation (Fig S7). Reduced DE-Cadherin in the PSC led to decreased *dad*-GFP and Dlp expression, suggesting that DE-Cadherin was required for normal accumulation of Dlp protein in PSC cells and, in turn BMP activity and, ultimately PSC cell number. *DE-cadherin* (*shg*) heterozygous mutants showed a mild PSC phenotype that was increased in *robo2* and *DE-cadherin* trans-heterozygous mutant LGs confirming that DE-cadherin and Robo2 acted together to control PSC morphology (Fig 5g-j). Furthermore, while overexpression of DE-cadherin in the PSC had no effect by itself, overexpression of DE-cadherin in *robo KD* LGs partially rescued PSC cell numbers (Fig 5k-m). Furthermore, although the rescue of PSC cell clustering is non-significant, the overexpression of DE-Cadherin in *robo KD* LGs attenuates the PSC clustering defect of *robo KD* alone (Fig 5 N). The method used to quantify PSC clustering, reflects PSC cells dispersion of but does not take into account the number of PSC cells clusters. Counting PSC cells clusters indicate that while an average of 27 clusters (n=26 lobes) was measured in *robo KD*, approximately 5 (n=20 lobes) were observed when DE-cadherin was overexpressed in *robo KD*. This indicates that the overexpression of DE-cadherin in *robo KD* favour the formation of larger PSC cell clusters compared to *robo KD*, and thus it indicates a partial rescue of the PSC cell clustering defect. In conclusion, Robos are necessary for the accumulation of DE-cadherin in PSC cells, which in turn controls both their numbers and clustering.

Robo signalling controls PSC cell clustering by repressing Cdc42 activity

Incomplete rescue of the *robo KD* PSC clustering phenotype by DE-cadherin overexpression indicated that other Robo signalling targets were involved. The small RhoGTPase Cdc42, which acts on actin dynamics, was one obvious candidate since many studies have shown that Robo signalling represses Cdc42 activity [26, 41]. While the expression of a dominant negative form of Cdc42 (Cdc42DN) in the PSC did not affect clustering but slightly decreased the number of PSC cells (Fig 6f, h-i), the expression of

a constitutively active form (Cdc42CA) led to a clustering defect without affecting PSC cell numbers (Fig 6a-d). These data indicate that Cdc42 must be inactivated to maintain PSC cell clustering. To determine whether Cdc42 inactivation and Robo signalling were functionally linked, we performed rescue experiments. The expression of the inactive form (Cdc42DN) in *robo2 KD* PSC rescued cell clustering defects (Fig 6e-i), showing that Robo signalling controls PSC cell clustering by repressing Cdc42 activity. *Vilse* encodes a Rho GAP that binds a conserved domain, CC2, in the intracellular part of Robo1 and links Robo1 signalling to rac and Cdc42 activities in *Drosophila* tracheal cells and axons [42, 43]. However, *Vilse* does not bind the Robo2 receptor [28, 42]. We analysed the PSC morphology in *vilse1/+* heterozygous mutant LGs. While no change in PSC cell numbers was observed, there was a clustering defect (Fig 6j-m), suggesting that *vilse* could contribute to PSC cell clustering. To test this possibility we performed rescue experiments by overexpressing *vilse* in *robo KD* PSCs. We observed 60% of the LGs (n=10 lobes) have not clustering defects indicating a partial rescue of PSC cell clustering defect (Fig 6q). Altogether, this suggests that *vilse* might function downstream of Robo signalling to control PSC cell clustering via regulating Cdc42 activity.

Discussion

The dependence of hematopoietic cell homeostasis on signals from the niche has been established in both vertebrates and *Drosophila* [2, 3, 44-47]. Like the niche in mammals, PSC size must be controlled to maintain normal LG hematopoietic homeostasis. However, mechanisms controlling the size and the morphology of the niches are poorly understood. Here we provide evidence that the *Drosophila* cardiac tube (CT) is required to maintain the PSC morphology and in turn its function. This is the first demonstration that communication between the vascular system and the hematopoietic niche exists in *Drosophila*. We establish that this communication is mediated by Slit/Robo signalling. Slit from the CT activates Robo receptors in the PSC which control both the number and clustering of PSC niche cells. Our data reveal a new signalling cascade, with Robo acting on the accumulation of the HSPG Dally-like (Dlp), required for BMP/Dpp signalling in the PSC, and controlling PSC cell proliferation via *dmyc*

repression. Furthermore, our data establish that Slit/Robo signalling also acts via DE-Cadherin upregulation and Cdc42 inactivation in order to modulate PSC cell clustering. A summary integrative model is given in Fig 7.

Since its discovery as a key regulator of axon guidance, both in *Drosophila* and in vertebrates, the Slit/Robo signalling pathway has been implicated in the regulation of different developmental processes, including cell adhesion, cell migration and cell proliferation, depending upon the tissue context. Furthermore, it has been shown to act either as an oncogene and/or a tumor suppressor [22, 24, 48]. Our finding that Slit/Robo signalling regulates both proliferation and clustering of *Drosophila* PSC cells, is the first demonstration that this pathway signalling can coordinate both processes in the same group of cells. An independent study reported that *bag of marbles (bam)*, a putative translational regulator, controls the number and clustering of PSC cells, through its interactions with the Insulin-like growth factor pathway and Retinoblastoma (Rbf)-family protein [21]. It has been proposed that Bam/Rbf could regulate PSC cell numbers by repressing *dmyc* expression in parallel to BMP(Dpp)/Wnt(Wg) signalling, but the PSC clustering defect was not addressed. Thus, several signalling pathways may converge to regulate precisely the number and clustering of PSC cells. Whether Robo signalling and Bam/Rbf interact to control PSC cell clustering remains an open question.

Previous studies established that Slit/Robo signalling regulates cell motility or adhesion by controlling the activity of small Rho GTPases such as Rho, Rac, and Cdc42 and Cadherin, but the underlying molecular mechanisms are poorly understood [26, 38, 49]. In *Drosophila* tracheal cells and axons, activation of Robo1 by Slit results in the recruitment and activation of Vilse, a Rac/Cdc42 GAP. Vilse binds to one conserved domain (called CC2) of the intracellular domain of the Robo1 receptor, while Robo2 lacks this domain [42, 43]. We have now shown that PSC cell clustering requires the inactivation of Cdc42 under the control of Slit/Robo signalling and that Vilse could contribute to this process, probably by binding Robo1. However, Robo2 is the main actor in the PSC, and the mechanisms by which it represses Cdc42 activity remain to be discovered.

Proper formation of the *Drosophila* embryonic cardiac tube requires both Robo1 and Robo2 receptors, which act in part by controlling the dynamic distribution of DE-Cadherin in post-mitotic cardiomyocytes during lumen formation [32-34, 36]. Our data show that Slit/Robo signalling controls the expression of DE-Cadherin in PSC cells and that DE-Cadherin regulates PSC cell clustering and proliferation, via the regulation of the HSPG Dlp accumulation. Previous studies performed in mammary epithelial tumor cells pointed to coordinated changes in the expression of Syndecan1, another transmembrane HSPG, and E-Cadherin during epithelial cell transformation [50]. Together, these studies and our data suggest that HSPG distribution by Cadherin was used both in mammals and in invertebrates and could be involved in either normal or tumorigenic processes.

In mammals the micro-environment that controls HSC self-renewal and differentiation in the bone marrow has two components: an endosteal (osteoblastic) niche and a vascular niche [45-47]. Even though there is a growing body of knowledge on mammalian hematopoietic niche function, the importance of crosstalk between the endosteal and vascular niches has not been addressed so far. Our study in *Drosophila* demonstrates for the first time communication between the vascular system and the hematopoietic niche, raising the question of whether this communication also exists between the endosteal and vascular niches in mammals. Recent profiling studies indicate that Slit ligands (Slit1-3) and Robo receptors (Robo 1-4) are expressed in the mouse bone marrow [51-53]. Considering the low genetic redundancy in *Drosophila*, and the high degree of conservation of fundamental cellular functions and signalling pathways between *Drosophila* and vertebrates, there is promise that our newly identified regulation will guide further work in the more complex process of mammalian hematopoiesis.

Acknowledgements. We thank J. Castelli-Gair Hombria, B. Dickson, L. Perrin, C. Samakovlis, T. Volk, Bloomington and Vienna Stock Center and the TRiP at Harvard Medical School for fly strains; I. Ando, A. Moore and T. Trenczek for antibodies ; L. Bataillé, J.L. Frendo, A. Davy, M. Meister, C. Monod, S. Plaza

and M. Suzanne for critical reading of the manuscript. We are grateful to B. Ronsin for assistance with confocal microscopy (Plateforme TRIO); O. Bohner, J. Favier, and V. Nicolas for fly culture. Works in authors' laboratory is supported by CNRS, University Toulouse III, Ministère de la Recherche (ANR « programme blanc »), ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer) and FRM (Fondation pour la Recherche Médicale).

Figure Legends

Figure 1: Robo2 receptor is expressed in PSC cells and Robo signalling controls PSC cell number, clustering and function.

(a) Robo2-HA (HA, green) in the LG is expressed in PSC cells marked by Col (red). (a', a'') Enlarged views showing co-localization of Col with Robo2-HA. (b) *robo2^{Ex33}/+* heterozygous mutant LGs display a larger and disrupted PSC as stained by Antp (red). (e,f) PSC cells are stained by Col (red, e) or Antp (red, f) or express mcd8-GFP (*col>GFP*, green, f). Reducing *robo2* (*robo2 KD*) (e) or *robo1*, 2 and 3 simultaneously (*robo KD*) (f) in the PSC leads to an increased number of PSC cells and their deficient clustering. (c, g) Quantification of PSC cell numbers. (d, h) Quantification of PSC cell clustering. (i, j) wt (i) and *robo KD* (j) LGs stained for PSC cells (Col, green) and crystal cells (proPO, red). Compared to wt LGs (i) fewer crystal cells differentiate in *robo KD* lymph glands (j). (k) Crystal cell index. (l, m) wt (l) and *robo KD* (m) LGs stained for plasmacyte (P1, red). Compared to wt LGs (l) fewer plasmacytes differentiate in *robo KD* lymph glands (m). (n) Plasmacyte index. For all quantifications and in all figures: error bars represent SEM and *P<0.1; **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001 and ns (not significant); Student t test. In all figures nuclei are labelled with Topro or DAPI (blue) and scale bars: 10µm.

Fig 2: Robo receptors are required to control PSC morphology during larval development and MZ lineage tracing.

(a-f) Antp (red) and GFP (green) label PSC cells in control (*col>GFP*) (a-c) and in *col>robo KD* LGs (d-f). (a, d) L1 larvae, (b, e) L2 larvae and (c, f) early L3 larvae. (g, j) Antp (red) and GFP (green) label PSC cells in Gal 80ts context; control (*col>*) (g, i) and in *col>robo KD* LGs (h, j). The temperature shift (18°C to 29°C) was performed in L1 (g, h) or L2 (i, j) and LG were analysed in L3. (k-n) Antp (red) labels PSC cells (k,m) and GFP (green) labels MZ lineage traced cells in control (*dome>Flp; ubi>FRT>GFP*) (k, l) and in *robo2^{Ex33}/+* heterozygous mutant (*dome>Flp; ubi>FRT>GFP; robo2^{Ex33}/+*) (m, n). Nuclei are labelled with DAPI (blue) (a-n). Scale bars: 10µm.

Figure 3 : Slit expressed in the cardiac tube is required to control PSC morphology.

(a-b') PSC cells express GFP (*col>GFP*, green) under the PSC *col* driver. Slit (red in a, b and white in b') is expressed at high levels in the cardiac tube indicated by a star. (b-b') Enlarged views showing weak Slit expression in PSC cells (red in b and white in b'). (c, d) PSC cells are labelled by Col (red) and the cardiac tube expresses GFP under the control of the cardiac tube driver *HandΔ* (*handΔ>GFP*, green). Compared to control (c), reducing Slit levels in the cardiac tube leads to an increased number of PSC cells and the loss of their clustering (d). (e, f) Quantification of PSC cell numbers and PSC cell clustering, respectively. (g) Antp (red) labels PSC in *handΔ>slit KD>Slit-N*. The *slit KD* PSC defect is rescued by *Slit-N* overexpression in the CT. (h, i) Quantification of PSC cell numbers (h) and PSC cell clustering (i); * corresponds to the comparison to wt, whereas * above a bar indicates the two conditions being compared. (j) Antp (red) labels the PSC in *slit²/+* heterozygote mutant. (k, l) Quantification of PSC cell numbers (k) and PSC cell clustering (l). (m, n) crystal cells are labelled by proPO antibody (red) and the cardiac tube expresses GFP (*handΔ>GFP*, green) under the control of the cardiac tube driver *HandΔ*. Fewer crystal cells differentiate in LGs when *slit* expression is decreased in the cardiac tube (n), compared to wt (m). (o) Crystal cell index in (m, n) contexts.

Figure 4: Robo receptors in the PSC control PSC cell proliferation through the activation of the BMP/Dpp signalling pathway and the accumulation of the Dally-like Heparan Sulfate Proteoglycan protein.

(a, b) H3P staining (red) in the presence or absence of *robos* in PSC cells (green). (c) Mitotic index in the PSC and (MZ+CZ) in wt and *robo KD* LG. (d-e') PSC cells express RFP (red) under the PSC *col* driver in wt (d) and in *robo KD* (e). *dmyc* staining (green) (d, e) and white (d', e'). (f) Quantification of *dmyc* mean intensity in PSC cell in wt and in *robo KD*. (g, h) PSC cells are stained by Antp (red) and express GFP (*Col>GFP*, green). Reduction of *dmyc* expression in the PSC (g) slightly reduces the number of PSC cells; *dmyc* reduction in *robo KD* PSCs rescues the number of PSC cells but not their clustering (h). (i, p) Quantification of PSC cell numbers (i) and PSC cell clustering (p) under various mutant conditions. (j, k') *dad-GFP* (green) is expressed in PSC cells labelled by *Col* (red). Compared to wt (j, j') *robo KD* PSC (k, k') expresses a lower level of *dad-GFP*. (l-m') *Dlp* (red) is expressed in PSC cells labelled by GFP (green). Compared to control (l, l'), *robo KD* PSC (m, m') expresses a lower level of *Dlp*. (n, o) PSC cells express GFP (green) and are stained by Antp (red). The overexpression of *Dlp* in the PSC slightly reduces the number of PSC cells (n, i), in *robo KD* this restores a wt number of PSC cells but not their clustering (o, i, p). (q, r) Antp (red) and *Dlp-GFP* (green) label PSC cells in wt (q) and *robo KD* (r). All PSC cells express GFP both in wt and *robo KD*.

Figure 5: Robo receptors control the number and clustering of PSC cells via DE-cadherin.

(a-b') L2/Early L3 LGs where DE-Cadherin-GFP (green in a, b; black in a', b') is expressed in PSC cells labelled by Antp (red in a, b). Compared to wt (a, a') *robo KD* LGs (b, b') express a lower level of DE-Cadherin-GFP in the PSC. (c, d) Antp (green) and RFP (*col>moeRFP*, red) label PSC cells in control (c) and in *col>DE-cadherin KD* PSC (d). (e, f, i, j, m, n) Quantification of PSC cell numbers (e, i, m) and PSC cell clustering (f, j, n) in various mutant conditions. Reduction of *DE-cadherin* in the PSC (d) leads to an increased number of PSC cells compared to control (c). Averaging the clustering of all *DE-Cad KD* LGs

(n=44 lobes) does not reveal a significant clustering defect. However, these LGs can be divided into two classes: clustered (66%) and unclustered (33%), revealing a clustering defect (f). (g, h) Antp (red) labels the PSC in *DE-cadherin* mutant (*shotgun, shg*) *shg*^{GE13814}/+ heterozygote (g) and *shg*^{GE13814}/+; *robo2*^{EX33}/+ trans-heterozygote mutant (h). A stronger PSC defect is observed in *shg*^{GE13814}/+; *robo2*^{EX33}/+ trans-heterozygote compared to the single *shg*^{GE13814}/+ heterozygous mutants. For *robo2*^{EX33}/+ trans-heterozygote mutant, analysed in parallel to *shg*^{GE13814}/+; *robo2*^{EX33}/+ trans-heterozygote, the quantification of PSC cell numbers and clustering for *robo2*^{EX33}/+ heterozygote is given in Fig 1c-d. (k, l) Antp (red) and GFP (green) label PSC cells when DE-cadherin (DE-Cad) is overexpressed (k) or when *robo* KD and DE-cadherin are co-expressed in the PSC (l).

Figure 6: Robo receptors control PSC cell clustering by repressing Cdc42 activity.

(a, b) LifeactGFP (green) is expressed in PSC cells under the control of the *col* driver (*col*>) (a) and co-expressed with a constitutive form of Cdc42 (*cdc42*-CA) (b). (c, d) Quantification of PSC cell numbers (c) and PSC cell clustering (d). (e-g) Antp (green) and RFP (*col*>*moeRFP*, red) label PSC cells in *robo2* KD (e), when a dominant negative form of Cdc42 (*cdc42*-DN) is expressed (f) or when *robo2* KD and *cdc42*-DN are co-expressed in the PSC (g). While the expression of *cdc42*-DN has no major effect on PSC cells (f), its co-expression in *robo2* KD (g) rescues the *robo2* KD PSC defect (e). (h, i) Quantification of PSC cell numbers (h) and PSC cell clustering (i). (j, k) Antp (red) labels PSC cells in *vilse*¹/+ heterozygous mutant (j) and in *vilse*¹/+; *robo2*^{EX33}/+ trans heterozygous mutant (k). (l, m) Quantification of PSC cell number (l) and PSC cell clustering (m). A PSC cell clustering defect is observed in *vilse*¹/+ heterozygous mutant. (n, o) Antp (red) labels PSC cells in *col*>*vilse* (n) and *col*>*vilse*>*robo* KD (o). (p, q) Quantification of PSC cell numbers (p) and PSC cell clustering (q). Averaging the clustering of all *col*>*robo* KD>*vilse* LGs does not reveal a significant clustering defect (Fig 6q). However, these LGs (n= 10 lobes) can be divided into two classes: clustered (60%) and unclustered (40%), revealing a partial rescue of PSS cell clustering defect. Nuclei are labelled with Topro (blue). Scale bars: 10µm.

Figure 7: A integrative model for the role of Robo signalling in the PSC

Schematic diagram of a wt LG, with the PSC in red, the MZ in green, the CZ in blue and the CT in grey. Slit from the CT activates the Robo signalling pathway in the PSC. Robo signalling controls PSC cell clustering and proliferation. The maintenance of PSC morphology is required to maintain LG homeostasis. Proposed interactions between Robos, BMP/Dpp signalling, DE-Cadherin and Cdc42 activity for the control of PSC cell proliferation and clustering are indicated. Dlp expression in the PSC is also controlled by Collier/Knot (Col/kn) transcription factor, and Wnt/Wg signalling activates *dmec* expression [19].

Supplementary figures

Sup Fig 1 : Robo 1, 2 and 3 are expressed in the LG and are required to control PSC morphology .

(a-f'') PSC cells express GFP (green) under the PSC *col* driver in wt (a, c, e) and in *robo KD* (b, d, f). LGs and enlarged views of PSCs stained by Robo1 (red in a, a', b, b' and white in a'', b''), Robo2 (red in c, c', d, d' and white in c'' and d'') and Robo3 (red in e, e', f, f' and white in e'', f''). Arrows indicate crystal cells and a star indicates the cardiac tube. (g) Antp (red) labels PSC cells in *col>robo2 KD>robo2-HA*. (h, i) Quantification of PSC cell number (h) and PSC cell clustering (i). (j-l) PSC cells express GFP (green) under the PSC *col* driver in wt (j), in *robo1 KD* (k) and in *robo3 KD* (l). (m, n) Antp (red) labels PSC cells in wt (m) and in *antp>robo KD* (n). Nuclei are labelled with DAPI (blue). Scale bars: 10µm.

Sup Fig 2: Robo receptors are not required for Hh expression in the PSC .

(a-c') hh-GFP (green) labels PSC cells in control (a, a') and in *robo KD* LGs (c, c'); Antp (red) labels PSC cells (a, c). (b) Quantification of Hh-GFP mean intensity in PSC cell. Nuclei are labelled with Topro (blue) . Scale bars: 10µm.

Sup Fig 3: Ectopic expression of *robo2* or *slit* in the LG does not affect PSC morphology.

(a, d, g) PSC cells express GFP (green) under the PSC *col* driver in wt (a) and in conditions of *robo2-HA* (d) or *slit-N* (g) over/ectopic expression. (b, e, h) Antp (red) labels PSC cells, GFP (*dome>GFP*, green) labels MZ cells in control (b) and in conditions of *robo2-HA* (e) or *slit-N* (h) ectopic/overexpression. (c, f, i) Antp (red) labels PSC cells, GFP (*handΔ>GFP*, green) labels CT cells in control (c) and in conditions of *robo2-HA* (f) or *slit-N* (i) ectopic/overexpression. (j-l) Quantification of PSC cell number when *col* (j), *dome* (k) and *handΔ* (l) drivers are used. Nuclei are labelled with Topro (blue) (a-i). Scale bars: 10μm.

Sup Fig 4: *slit* dsRNA treatment strongly reduces the amount of Slit in the cardiac tube (CT) and does not affect CT morphology.

(a, a') *handΔ>* and (b, b') *handΔ>slit KD* LGs stained for Slit (red in a, b ; black in a', b'). Dashed lines delineate the CT (*) and the LG. (c, d) Antp (red) labels PSC cells in control (*NP1029>GFP*) (c) and in *slit KD* mutant (*NP1029>GFP>slit KD*) (d). Antp (red) labels also cardiac cells (arrowhead in d). (e, f) (GFP) labels the CT in control (*handΔ>GFP*) (e) and in *slit KD* (*handΔ>slit KD*) (f). 3D reconstructions of the CT, indicate that no defect in CT morphology is observed in *slit KD*. None of the two CT drivers, *HandΔ* (e) or *NP1029* (c) is expressed in the LG. (g, h) Col (red) labels the PSC in control (g) and in LG where Slit is decreased in PSC cells (*col>slit KD*) (h). No defect in PSC morphology is observed in *col>slit KD*. Nuclei are labelled with DAPI (blue). Scale bars: 10μm.

Sup Fig 5: Measurement of dad-GFP and Dlp intensity in *robo KD* mutant.

(a, b) dad-GFP (a) and Dlp (b) mean intensity in PSC cells in wt and in *robo KD*. (c) Quantitative RT-PCR of *dlp* relative to *antp* in wt and *robo KD* dissected LGs.

Sup Fig 6: Activity of the Wnt/Wg pathway is unaffected in *robo KD* PSC.

(a-c') Dfz3-RFP (red in a-c; black in a'-c') and GFP (green in a-c) under the control of the *col* driver (*col>GFP*) in wt PSC (a, a'), in *robo KD* PSCs (b, b') and in a PSC expressing a Dominant Negative form of dTCF (dTCF^{DN}) (c, c'). Whereas a weaker than normal RFP staining is observed in the PSC cells when the Wnt/Wg pathway is inactivated (c, c') no change is observed in *robo KD* (b, b') compared to wt PSC (a,

a'). Dashed line visualizes the PSC. (d) The intensity of RFP per PSC cell relative to other LG cells is given. Nuclei are labelled with DAPI (blue) (a-c). Scale bars: 10µm.

Sup Fig 7: DE-Cadherin controls Dlp and BMP/Dpp activity in the PSC.

(a-b') the PSC is visualised by lifeactGFP (green) in control (a, a') and DE-Cad KD (b, b') and Dlp expression is in red. Dashed line visualizes the PSC. (c) Quantification of Dlp means intensity in PSC cells. (d-e') Antp (red) labels the PSC in control (d, d') and in DE-Cad KD (e, e'), dad-GFP is in green. (f) Quantification of dad-GFP mean intensity in PSC cells. Decreasing DE-Cadherin in the PSC leads to the decrease of both Dlp (b, c) and dad-GFP (e, f) expression in PSC cells. Nuclei are labelled with Topro (blue). Scale bars: 10µm.

Movie S1 and S2: Robo signalling in the PSC controls PSC cell numbers and their clustering.

3D reconstruction of LGs expressing lifeactinGFP in the PSC (green) in control (S1) and *robo* KD (S2) larvae.

Materials and methods

Fly strains: w^{118} (wt) , UAS-mcd8GFP [2], dad-GFP (J. Casanova, Institut de Biologia Molecular de Barcelona, Barcelona, Spain), robo2^{Ex33} (G. Bashaw, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA), Robo2-HA (B. J. Dickson, Research Institute of Molecular Pathology, Vienna, Austria), *vilse*¹ and UAS-*vilse* (C. Samakovlis, Wenner-Gren Institute, Stockholm, Sweden), UAS-DE-cadherin and UAS-dmyc ds (C. Benasayag, Centre de Biologie du Développement, Université Toulouse III, Toulouse, France), DE-cadherin-GFP (Y. Hong, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, USA), antp-Gal4 and *UAS-RedStinger*, *UAS-ubi-STOP-Stinger*, *UAS-Flp/CyO* (G-TRACE), (U. Banerjee, Molecular Biology Institute, University of California, Los Angeles, USA) , handΔ-Gal4 and NP 1029-Gal4 (L. Perrin, TAGC/UMR 1090, Université, Aix Marseille, France), UAS-robo1,2,3 ds (robo KD) and *UAS-Slit-N* (T. Volk, Weizmann Institute of Science, Israel), Dlp-GFP (D. Harrison, University of Kentucky, USA), Dfrz3-RFP (gift from Dani Osman), *dad-GFP*, *Hh-GFP* and *col-Gal4* [2], *dome-Gal4* [2]. RNAi strains were provided by

the Bloomington and the Vienna *Drosophila* RNAi stock centres: *islet* (VDRC 108853 and BL 31467), *i robo1* (VDRC 100624 and BL 31663), *i robo2* (VDRC 11823 and BL 34589), *i robo3* (VDRC44702 and BL 29398) and *iDE-cad* (VDRC 103962). For *islet* and *i robo2* we mainly used VDRC 108853 and BL 34589, respectively. All other strains were provided by the Bloomington stock center. For RNAi treatments, *UAS-Dicer 2* was introduced and *Drosophila* development proceeded at 18°C until L1 stage before shifting to 29°C.

Antibody staining

Staining procedures were performed as described elsewhere[19, 54], using mouse anti-Col (1/200; [2]; guinea-pig anti-Col (1/5000; A. Moore, Doshisha University, Kyotanabe, Kyoto, Japan); rabbit anti-H3P (1/200; Upstate Biotechnology); mouse anti-proPO (1/200; T. Trenczel, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany); anti-P1 (1/30; I. Ando, Institute of Genetics, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Science, Szeged, Hungary) ; mouse anti-Antp (1/100), anti-Dlp (1/50), anti-Robo1 (1/10), anti-Robo3 (1/10) and anti-slit (1/10; Hybridoma Bank), rabbit anti-Robo2 (1/200; B. J. Dickson, Research Institute of Molecular Pathology, Vienna, Austria), mouse anti-HA (HA11; 1/100; Covance).

Quantification of PSC cell numbers

In all experiments, all genotypes were analysed in parallel and quantifications (either for PSC cell number or PSC cell clustering) given in one panel correspond to one experiment. Each experiment was repeated independently at least three times. PSC cells were counted manually using Fiji multi-point tool software. Statistical analyses t test (Mann–Whitney nonparametric test) was performed using GraphPad Prism 5 software.

Quantification of PSC cell clustering

3D Volocity software was used to define the ROIs (Region Of Interests) corresponding to the PSC stained by either Antp, or GFP, or RFP expressed under a PSC driver. The “close” function was used to increase artificially the size of the ROIs, leading to fusion of the touching areas. The number of iterations of the “close” function was increased until the number of ROIs per lobe reached one. The more

scattered was the PSC, the more distant were the initial ROIs, and the higher was the iteration number. The number of iterations thus measures “PSC cell clustering”. For computing time reasons, the iteration maximum was stopped at 50 times.

Quantification of expression intensity per cell

3 slides per stack were analysed. Fiji software was used to define the ROIs (Region Of Interests) corresponding to PSC cells. The mean intensity for Hh-GFP, Dad-GFP and Dlp in each ROI was quantified. For nuclear staining such as for Hh-GFP and Dad-GFP, Antp labelling was used to define ROIs. For membrane staining such as for Dlp, mcd8-GFP expressed under the Pcol driver was used to define ROIs.

Mitotic index measurement

For counting mitotic cells, anti-H3P staining was performed on Pcol>GFP (GFP-labelled PSC cells) and Pcol>GFP>robo KD LGs. The lymph gland size fluctuates from one larva to another, even in synchronised wild type larvae. Measuring the mitotic index is therefore the most reliable way to determine how proliferation is affected in a given mutant context, since it takes into account the variation in size between individual LGs of the same genotype. The mitotic index in the PSC was measured by dividing the total number of PSC cells by the number of H3P positive cells. The mitotic index in the MZ and CZ was measured by dividing the total number of MZ and CZ cells by the number of H3P positive cells. Using ICY software, the total number of cells stained by DAPI in the PSC, MZ and CZ was quantified, and the number of mitotic figures in a given LG was counted. At least 14 anterior lobes were scored per genotype. Statistical analyses t test (Mann–Whitney nonparametric test) was performed using GraphPad Prism 5 software).

Crystal cell and plasmatocyte quantification

Lymph glands were stained with proPO antibody (crystal cell) or P1 antibody (plasmatocyte) and DAPI or Topro (nuclei). Optimized confocal sections were done on Leica SPE or Zeiss 710 microscopes for 3D reconstructions. The number of crystal cells, the volume (in μm^3) of plasmatocytes and the volume (in μm^3) of each anterior lobe, were measured using Volocity 3D Image Analysis software (PerkinElmer).

Crystal cell index corresponds to the number of crystal cells/ (primary lobe volume/10000). Plasmatocyte index corresponds to the plasmatocyte volume/primary lobe volume. At least 15 anterior lobes were scored per genotype. Statistical analyses t test (Mann–Whitney nonparametric test) were performed using GraphPad Prism 5 software.

Intensity Ratio for dfz3-RFP

The mean intensity of dfz3-RFP staining per cell was determined using Fiji software. To calculate the intensity ratio of dfz3-RFP in PSC cells, the mean intensity of dfz3-RFP staining for five randomly selected PSC cells, was divided by the mean intensity of dfz3-RFP staining for five randomly selected MZ or CZ cells. Statistical analyses t test (Mann–Whitney nonparametric test) were performed using GraphPad Prism 5 software.

3D reconstruction Movies

LifeactinGFP was expressed in wt and *robo KD* PSC cells. Optimized z stacks were performed on Zeiss710 confocal microscope. PSCs 3D reconstruction and rotation were performed using 3D viewer plugin of Fiji software.

REFERENCES

1. Jung, S.H., et al., *The Drosophila lymph gland as a developmental model of hematopoiesis*. Development, 2005. **132**(11): p. 2521-33.
2. Krzemien, J., et al., *Control of blood cell homeostasis in Drosophila larvae by the posterior signalling centre*. Nature, 2007. **446**(7133): p. 325-8.
3. Mandal, L., et al., *A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains Drosophila haematopoietic precursors*. Nature, 2007. **446**(7133): p. 320-4.
4. Krzemien, J., M. Crozatier, and A. Vincent, *Ontogeny of the Drosophila larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(6-7): p. 1117-25.
5. Benmimoun, B., et al., *Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in Drosophila*. Development, 2012. **139**(10): p. 1713-7.
6. Dragojlovic-Munther, M. and J.A. Martinez-Agosto, *Multifaceted roles of PTEN and TSC orchestrate growth and differentiation of Drosophila blood progenitors*. Development, 2012. **139**(20): p. 3752-63.

7. Grigorian, M., et al., *The proteoglycan Trol controls the architecture of the extracellular matrix and balances proliferation and differentiation of blood progenitors in the Drosophila lymph gland*. Dev Biol, 2013. **384**(2): p. 301-12.
8. Lam, V., et al., *bantam miRNA is important for Drosophila blood cell homeostasis and a regulator of proliferation in the hematopoietic progenitor niche*. Biochem Biophys Res Commun, 2014.
9. Mondal, B.C., et al., *Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance*. Cell, 2011. **147**(7): p. 1589-600.
10. Mondal, B.C., et al., *Pvr expression regulators in equilibrium signal control and maintenance of Drosophila blood progenitors*. Elife, 2014. **3**: p. e03626.
11. Owusu-Ansah, E. and U. Banerjee, *Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation*. Nature, 2009. **461**(7263): p. 537-41.
12. Shim, J., T. Mukherjee, and U. Banerjee, *Direct sensing of systemic and nutritional signals by haematopoietic progenitors in Drosophila*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(4): p. 394-400.
13. Shim, J., et al., *Olfactory control of blood progenitor maintenance*. Cell, 2013. **155**(5): p. 1141-53.
14. Sinenko, S.A., et al., *Dual role of wingless signaling in stem-like hematopoietic precursor maintenance in Drosophila*. Dev Cell, 2009. **16**(5): p. 756-63.
15. Tokusumi, Y., et al., *Serpent, suppressor of hairless and U-shaped are crucial regulators of hedgehog niche expression and prohemocyte maintenance during Drosophila larval hematopoiesis*. Development, 2010. **137**(21): p. 3561-8.
16. Tokusumi, T., et al., *Germ line differentiation factor Bag of Marbles is a regulator of hematopoietic progenitor maintenance during Drosophila hematopoiesis*. Development, 2011. **138**(18): p. 3879-84.
17. Lam, V., et al., *bantam miRNA is important for Drosophila blood cell homeostasis and a regulator of proliferation in the hematopoietic progenitor niche*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **453**(3): p. 467-72.
18. Zhang, J., et al., *Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 836-41.
19. Penner, D., et al., *Size control of the Drosophila hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. 3389-94.
20. Tokusumi, Y., et al., *Gene regulatory networks controlling hematopoietic progenitor niche cell production and differentiation in the Drosophila lymph gland*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41604.
21. Tokusumi, T., et al., *Bag of Marbles controls the size and organization of the Drosophila hematopoietic niche through interactions with the Insulin-like growth factor pathway and Retinoblastoma-family protein*. Development, 2015.
22. Ballard, M.S. and L. Hinck, *A roundabout way to cancer*. Adv Cancer Res, 2012. **114**: p. 187-235.
23. Brose, K., et al., *Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance*. Cell, 1999. **96**(6): p. 795-806.
24. Borrell, V., et al., *Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors*. Neuron, 2012. **76**(2): p. 338-52.
25. Kidd, T., et al., *Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors*. Cell, 1998. **92**(2): p. 205-15.
26. Ypsilanti, A.R., Y. Zagar, and A. Chedotal, *Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo*. Development, 2010. **137**(12): p. 1939-52.
27. Spitzweck, B., M. Brankatschk, and B.J. Dickson, *Distinct protein domains and expression patterns confer divergent axon guidance functions for Drosophila Robo receptors*. Cell, 2010. **140**(3): p. 409-20.
28. McGuire, S.E., et al., *Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1765-8.

29. Evans, C.J., et al., *G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in Drosophila*. Nat Methods, 2009. **6**(8): p. 603-5.
30. Monier, B., et al., *Steroid-dependent modification of Hox function drives myocyte reprogramming in the Drosophila heart*. Development, 2005. **132**(23): p. 5283-93.
31. Ordan, E., et al., *Slit cleavage is essential for producing an active, stable, non-diffusible short-range signal that guides muscle migration*. Development, 2015. **142**(8): p. 1431-6.
32. Medioni, C., et al., *Genetic control of cell morphogenesis during Drosophila melanogaster cardiac tube formation*. J Cell Biol, 2008. **182**(2): p. 249-61.
33. Qian, L., J. Liu, and R. Bodmer, *Slit and Robo control cardiac cell polarity and morphogenesis*. Curr Biol, 2005. **15**(24): p. 2271-8.
34. Santiago-Martinez, E., et al., *Repulsion by Slit and Roundabout prevents Shotgun/E-cadherin-mediated cell adhesion during Drosophila heart tube lumen formation*. J Cell Biol, 2008. **182**(2): p. 241-8.
35. Zmoldzian, M., J.P. Da Ponte, and K. Jagla, *Cellular components and signals required for the cardiac outflow tract assembly in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(7): p. 2475-80.
36. Santiago-Martinez, E., N.H. Soplop, and S.G. Kramer, *Lateral positioning at the dorsal midline: Slit and Roundabout receptors guide Drosophila heart cell migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12441-6.
37. Vincent, J.P., *Modulating and measuring Wingless signalling*. Methods, 2014. **68**(1): p. 194-8.
38. Rhee, J., et al., *Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(8): p. 883-92.
39. Gao, H., X. Wu, and N. Fossett, *Drosophila E-cadherin functions in hematopoietic progenitors to maintain multipotency and block differentiation*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74684.
40. Huang, J., et al., *From the Cover: Directed, efficient, and versatile modifications of the Drosophila genome by genomic engineering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(20): p. 8284-9.
41. Wong, K., et al., *Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway*. Cell, 2001. **107**(2): p. 209-21.
42. Lundstrom, A., et al., *Vilse, a conserved Rac/Cdc42 GAP mediating Robo repulsion in tracheal cells and axons*. Genes Dev, 2004. **18**(17): p. 2161-71.
43. Hu, H., et al., *Cross GTPase-activating protein (CrossGAP)/Vilse links the Roundabout receptor to Rac to regulate midline repulsion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4613-8.
44. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
45. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
46. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
47. He, N., et al., *Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells*. Bone Marrow Res, 2014. **2014**: p. 128436.
48. Macias, H., et al., *SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number*. Dev Cell, 2011. **20**(6): p. 827-40.
49. Rhee, J., et al., *Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(10): p. 798-805.
50. Leppa, S., et al., *Syndecan-1 expression in mammary epithelial tumor cells is E-cadherin-dependent*. J Cell Sci, 1996. **109** (Pt 6): p. 1393-403.
51. Shibata, F., et al., *Roundabout 4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype*. Stem Cells, 2009. **27**(1): p. 183-90.
52. Smith-Berdan, S., et al., *Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches*. Cell Stem Cell, 2011. **8**(1): p. 72-83.

53. Geutskens, S.B., et al., *Control of human hematopoietic stem/progenitor cell migration by the extracellular matrix protein Slit3*. Lab Invest, 2012. **92**(8): p. 1129-39.
54. Krzemien, J., et al., *Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the Drosophila lymph gland*. Dev Biol, 2010. **346**(2): p. 310-9.

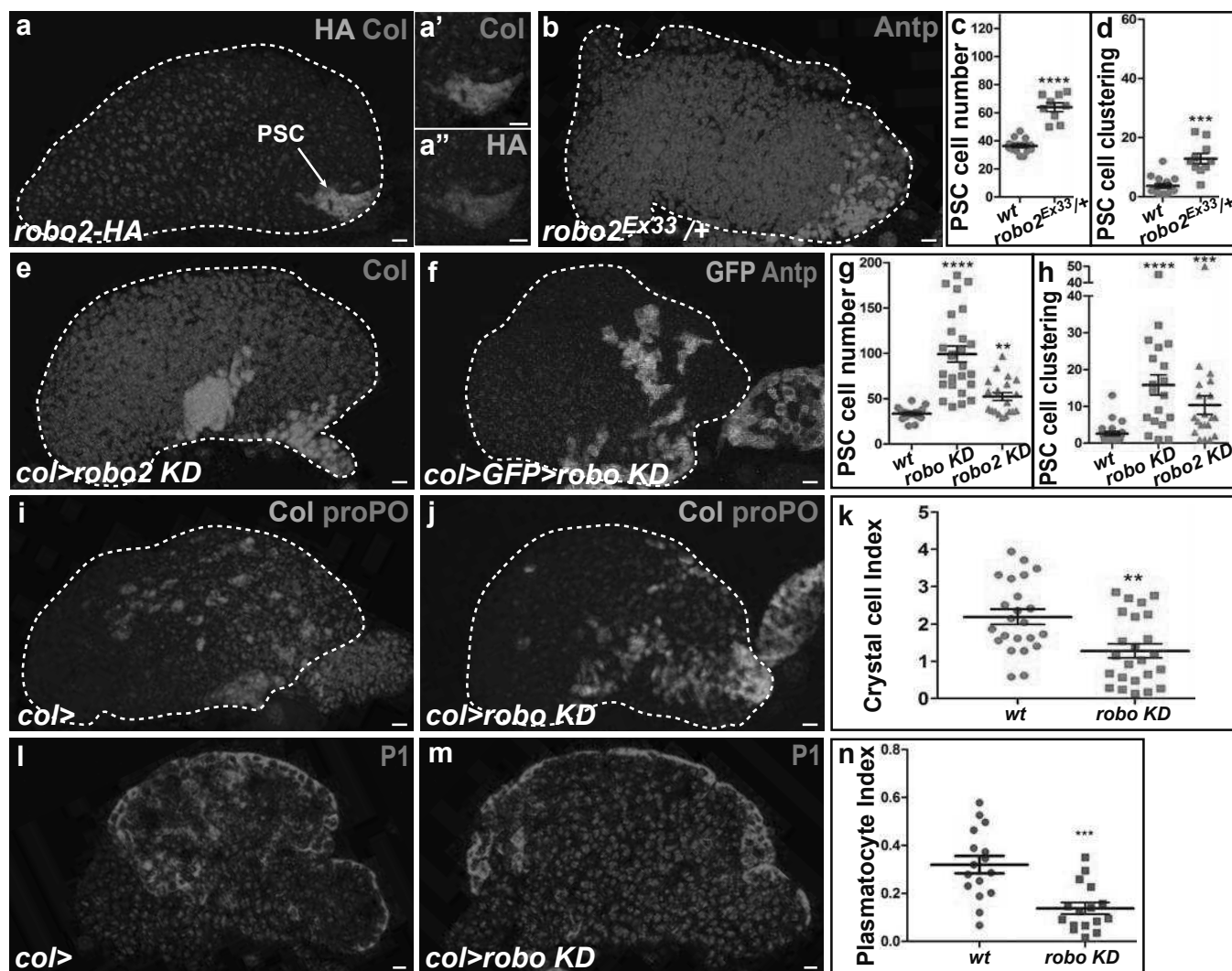


Figure 1

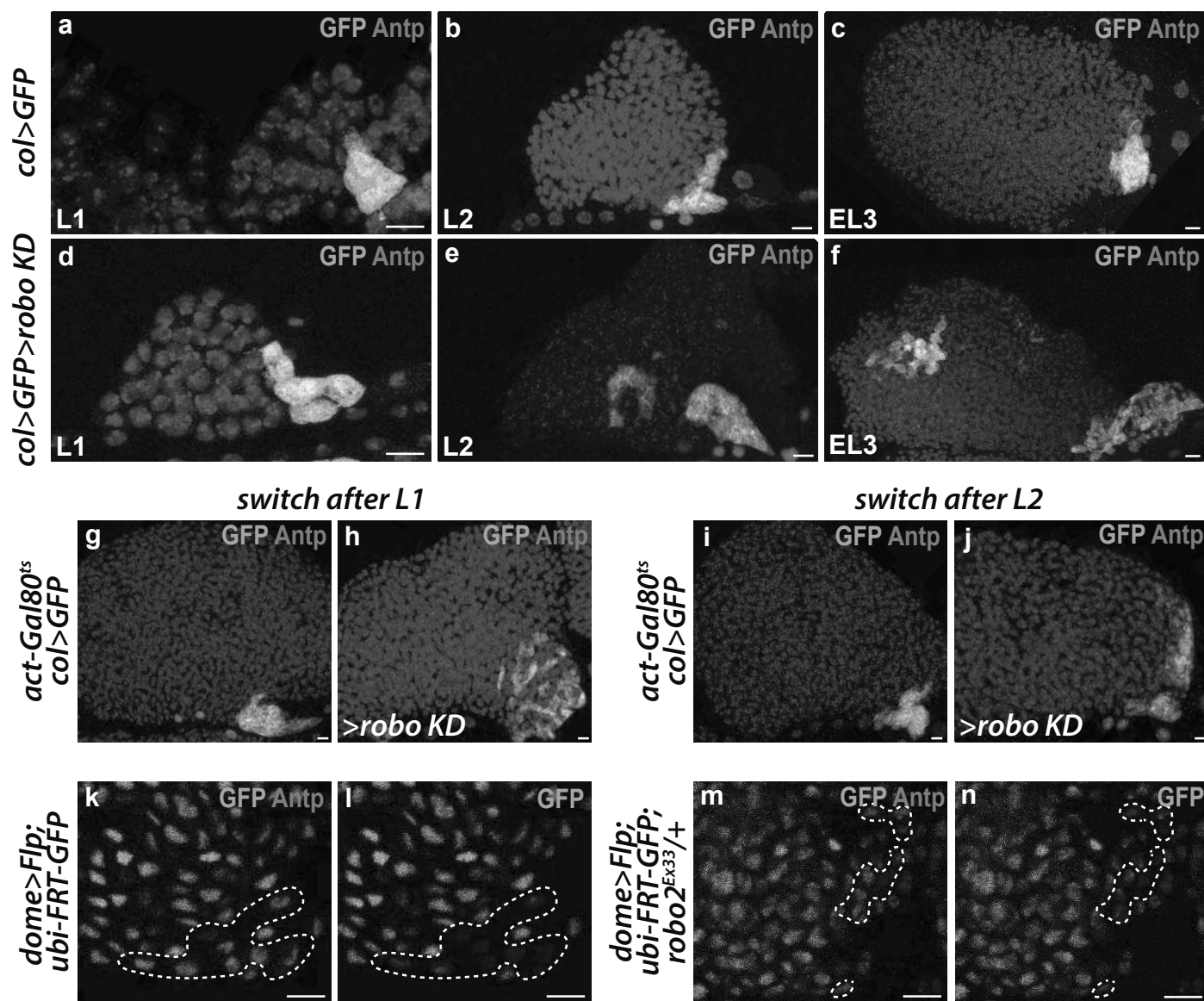


Figure 2

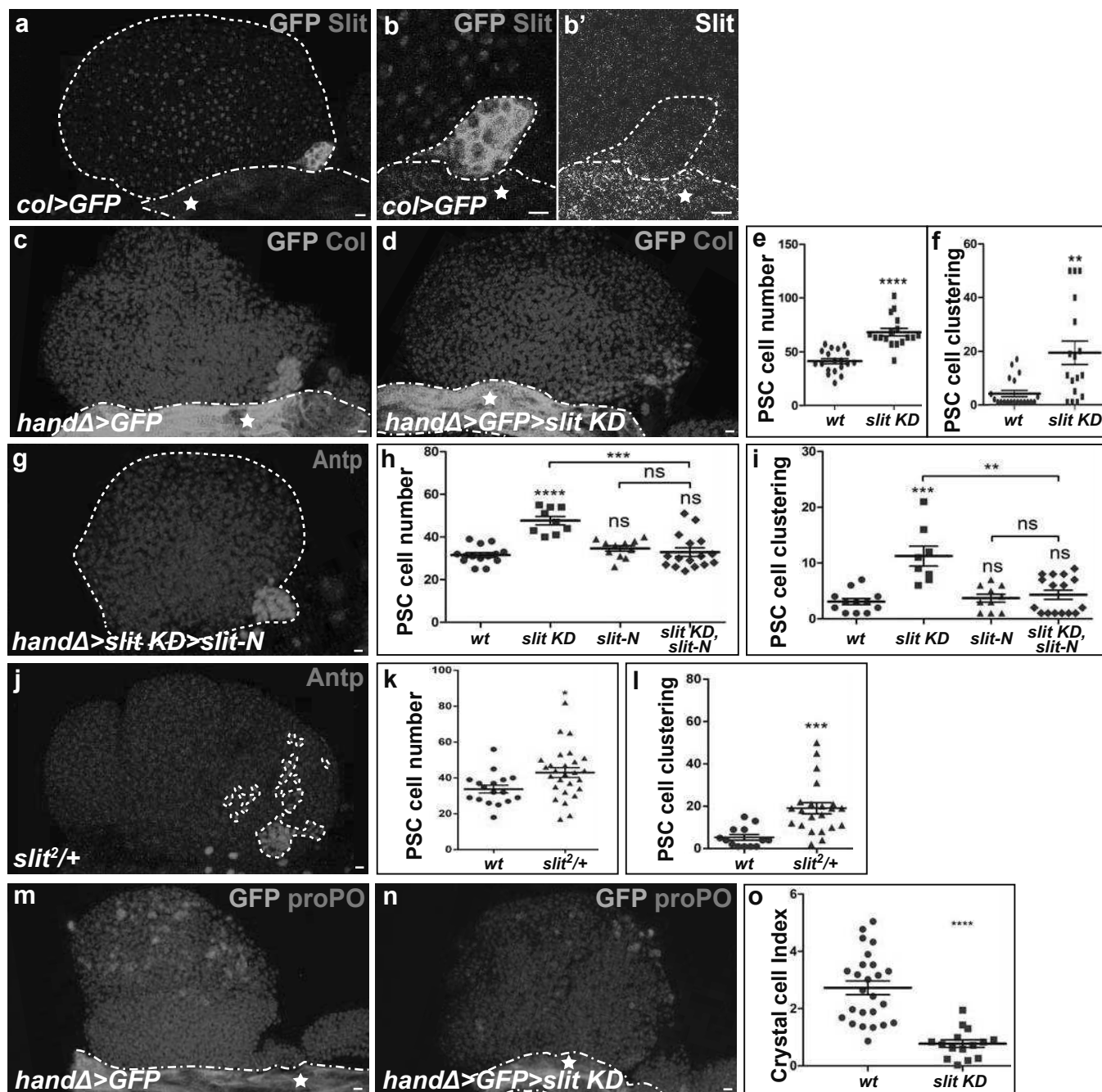


Figure 3

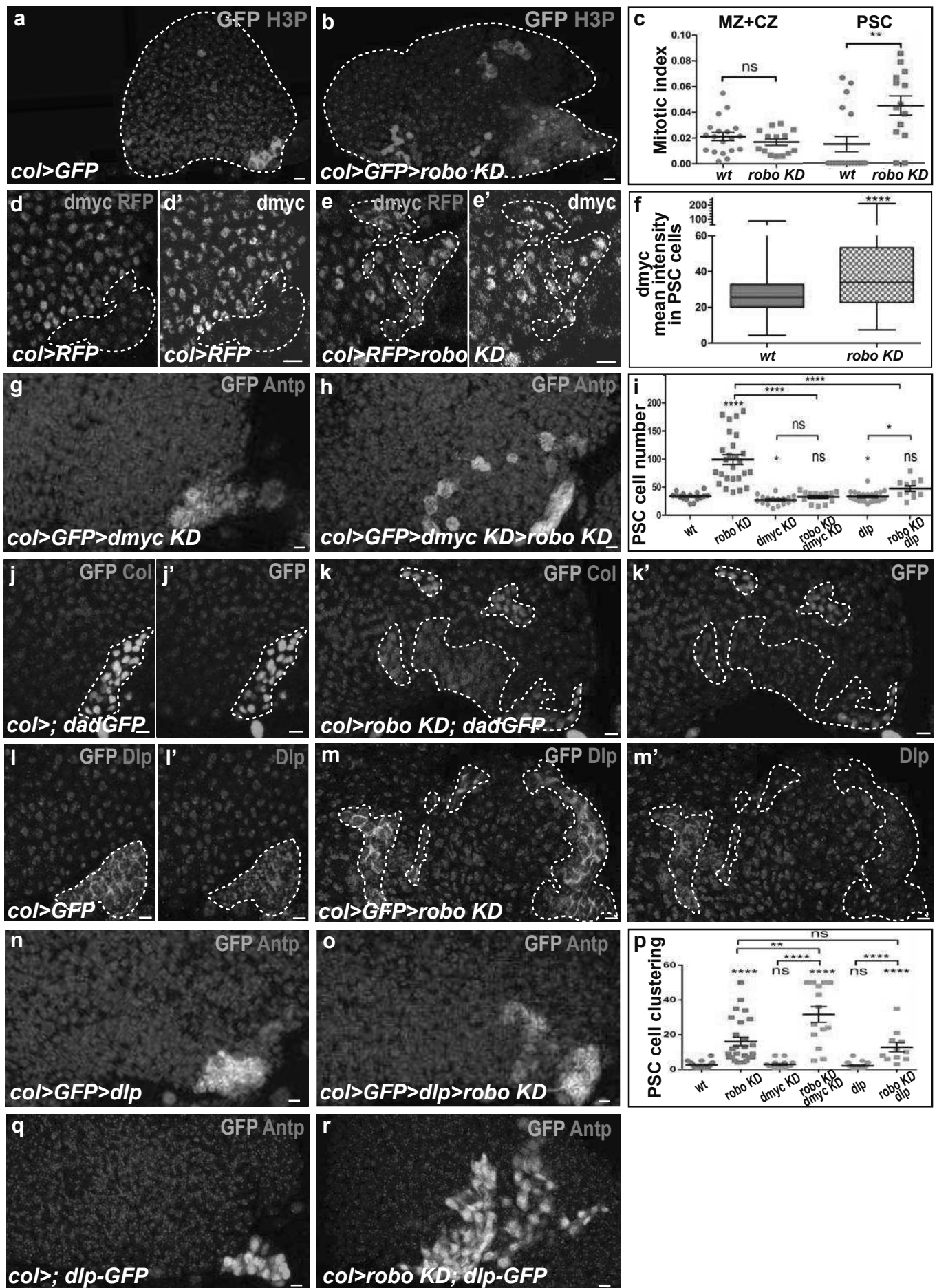


Figure 4

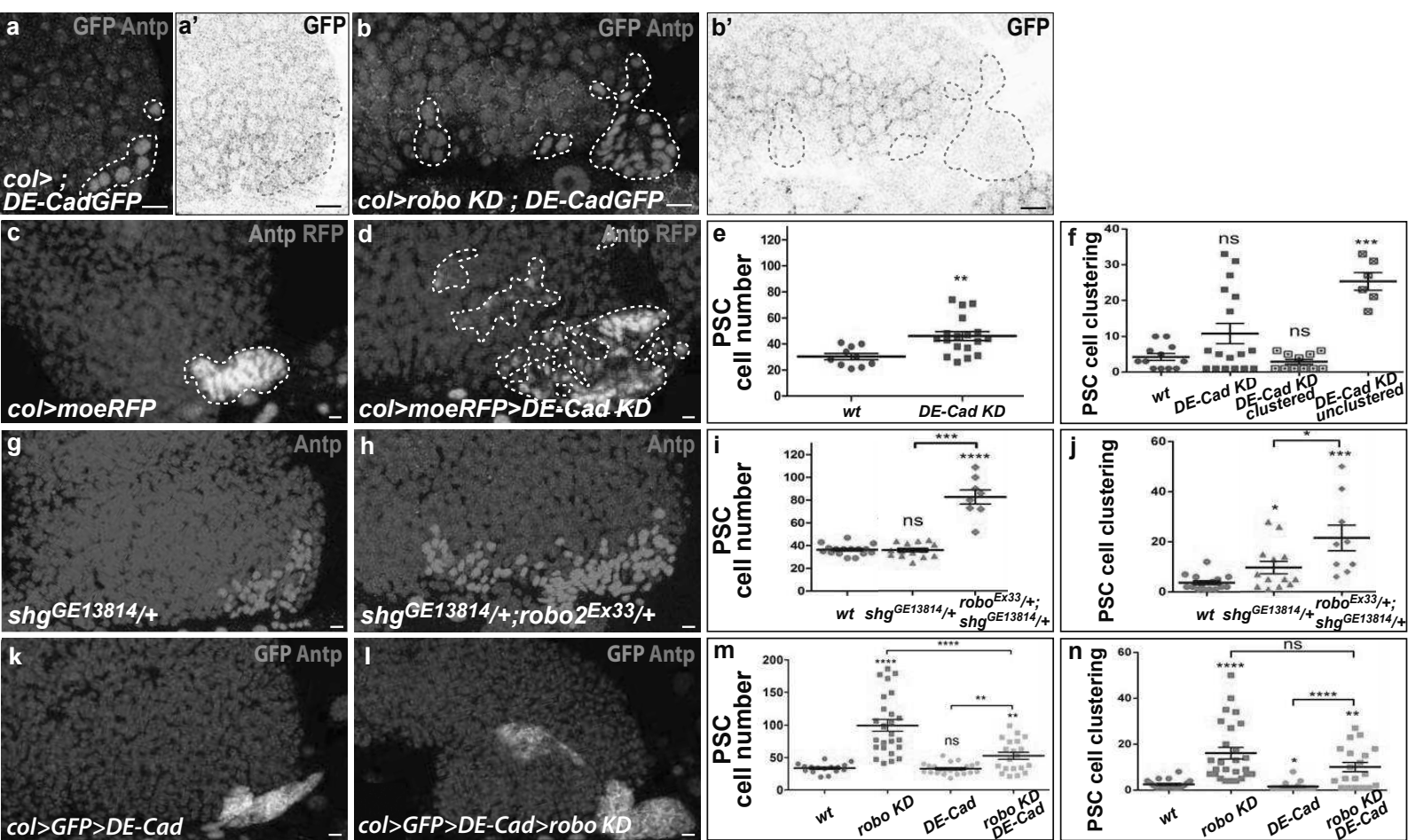


Figure 5

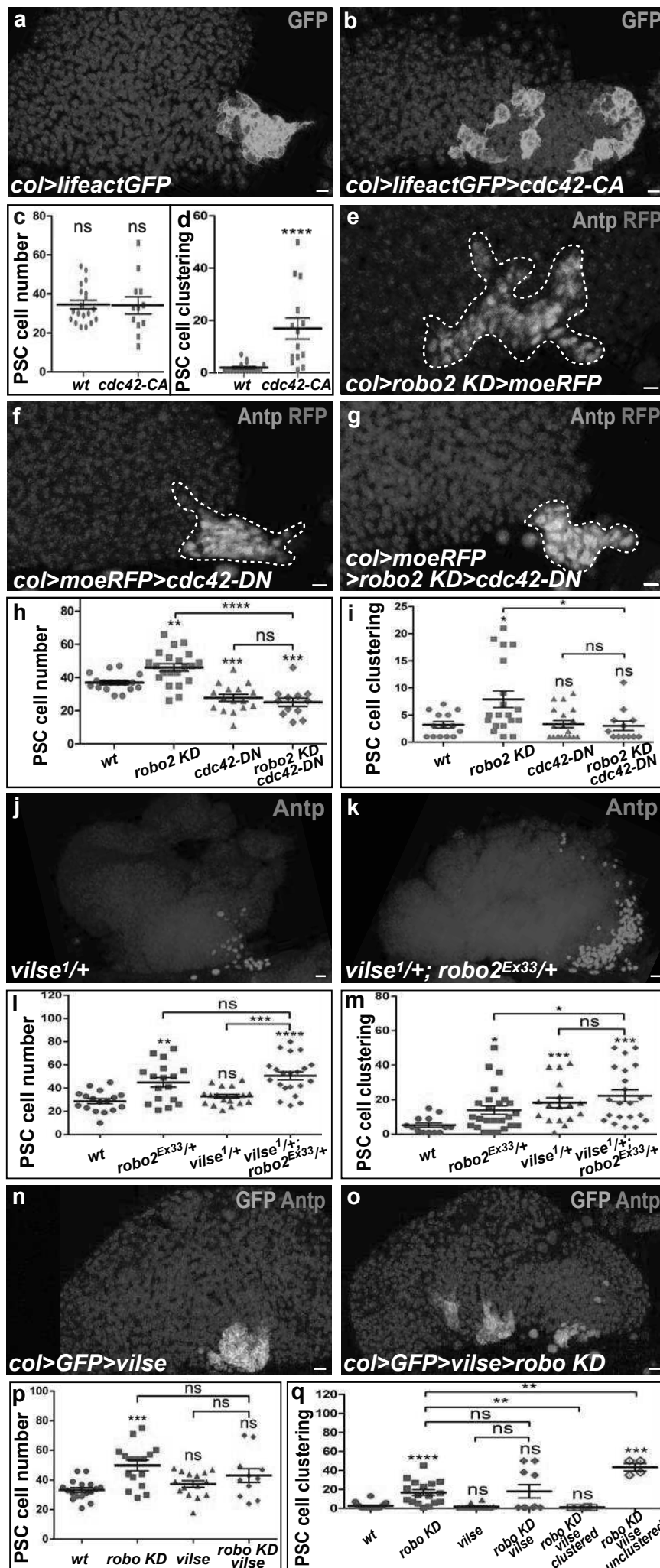
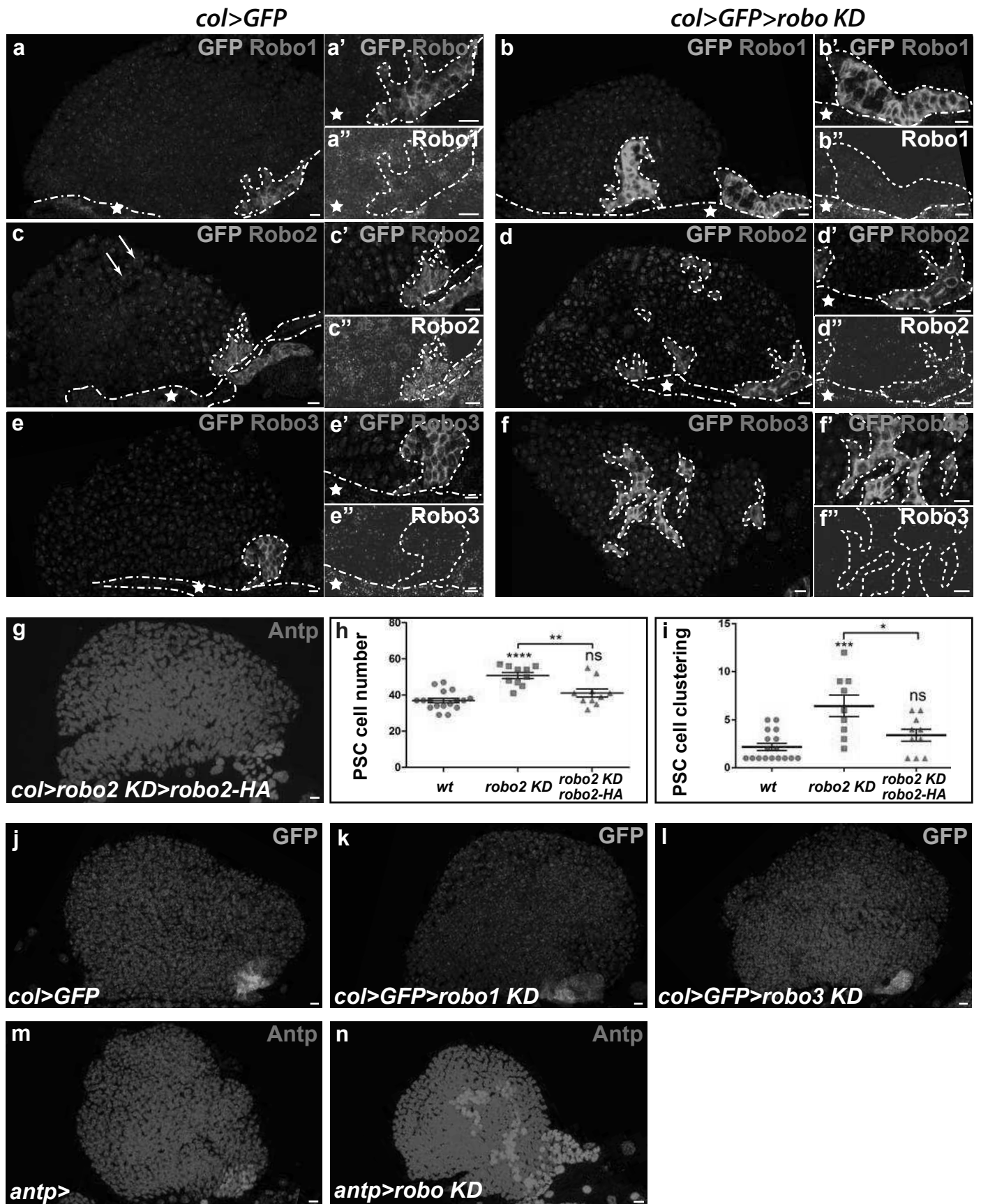
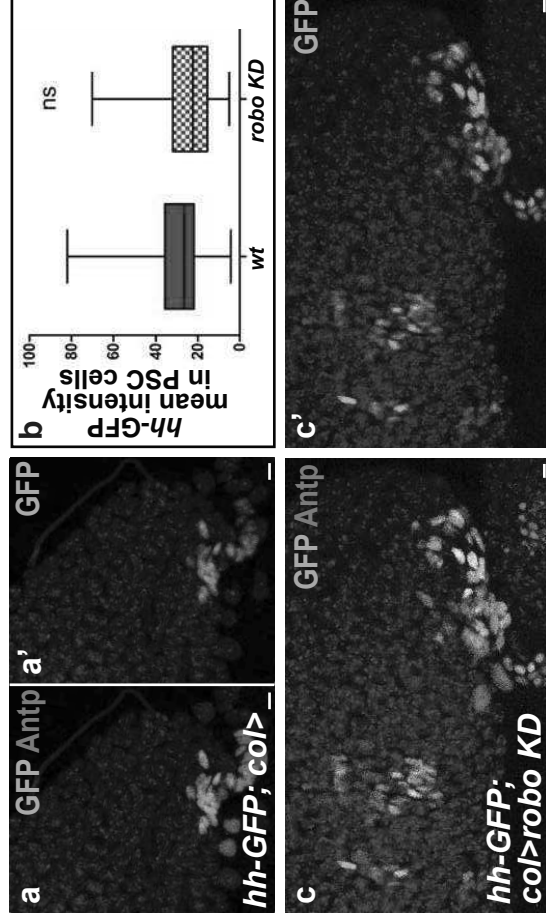


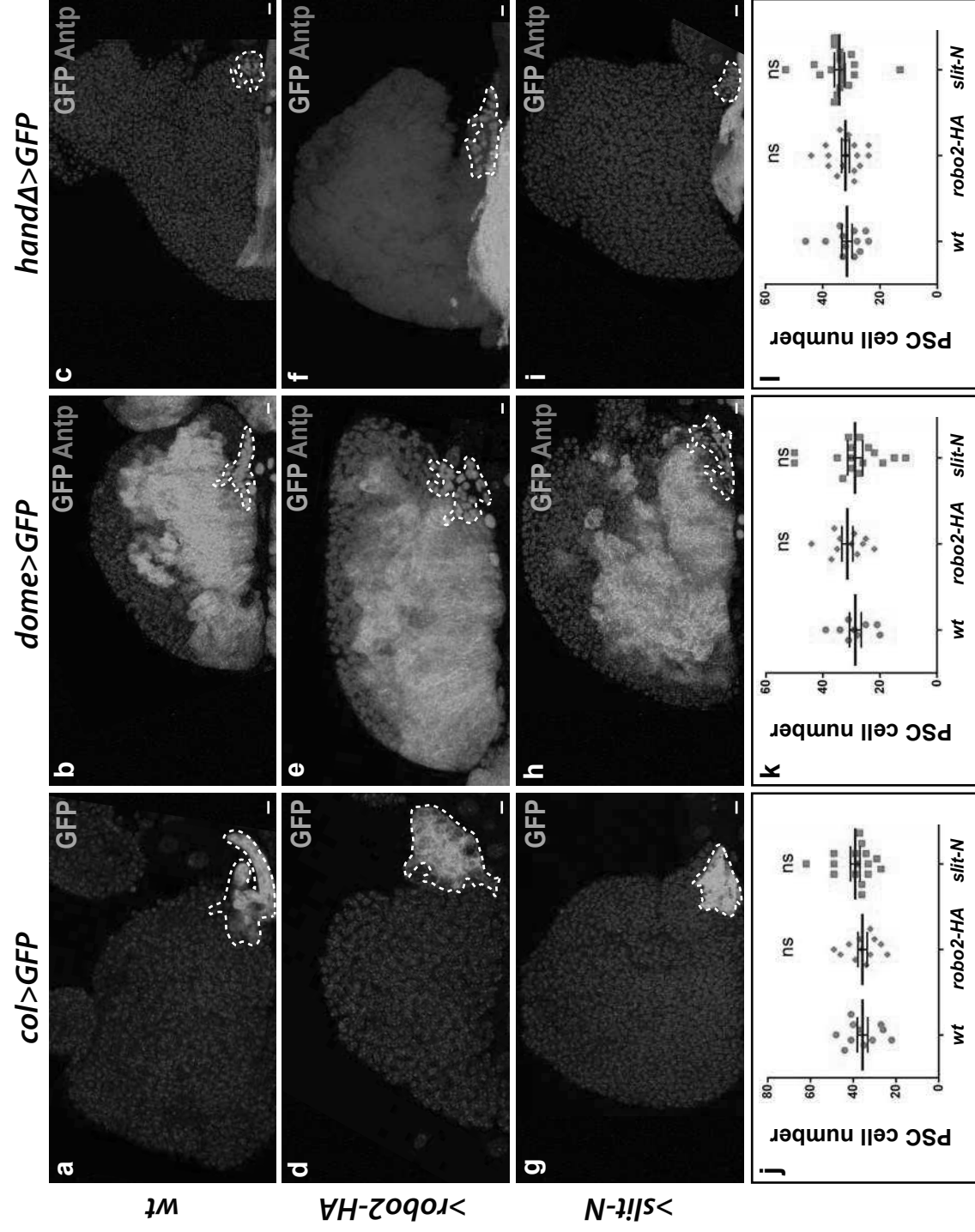
Figure 6



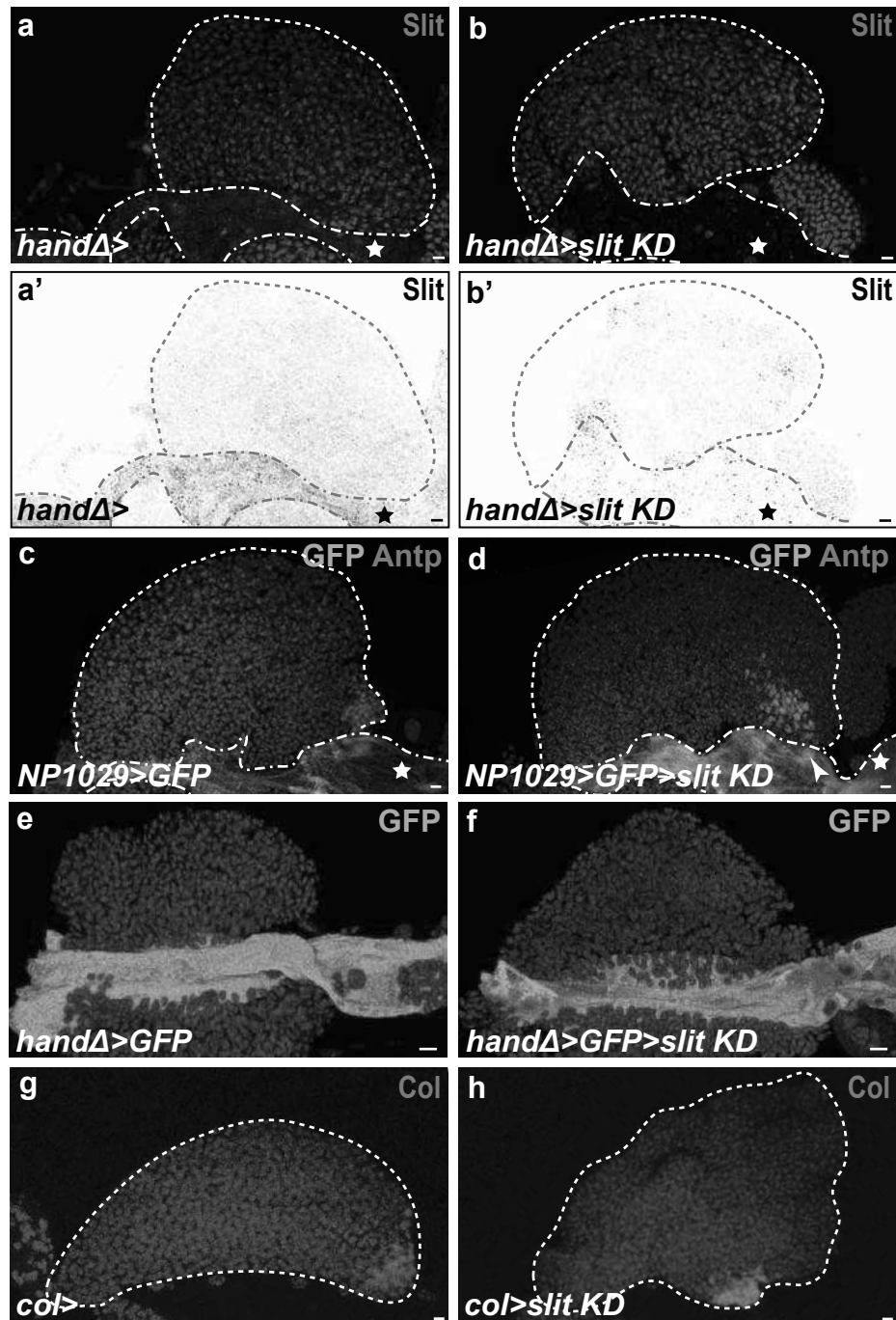
Supplementary Figure 1



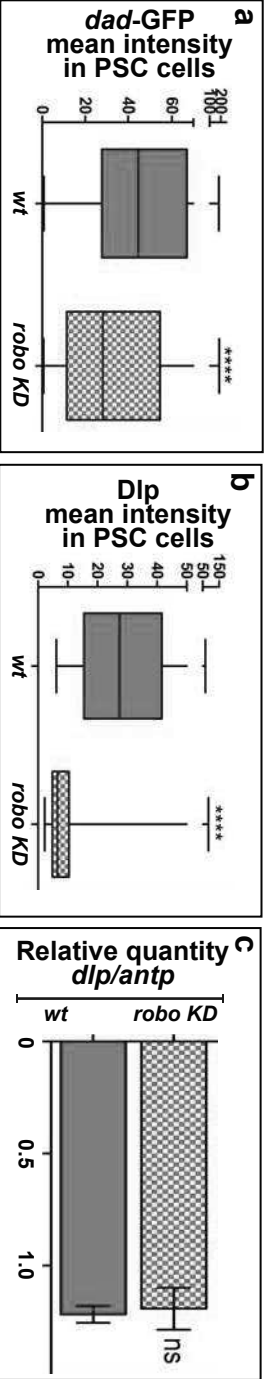
Supplementary Figure 2



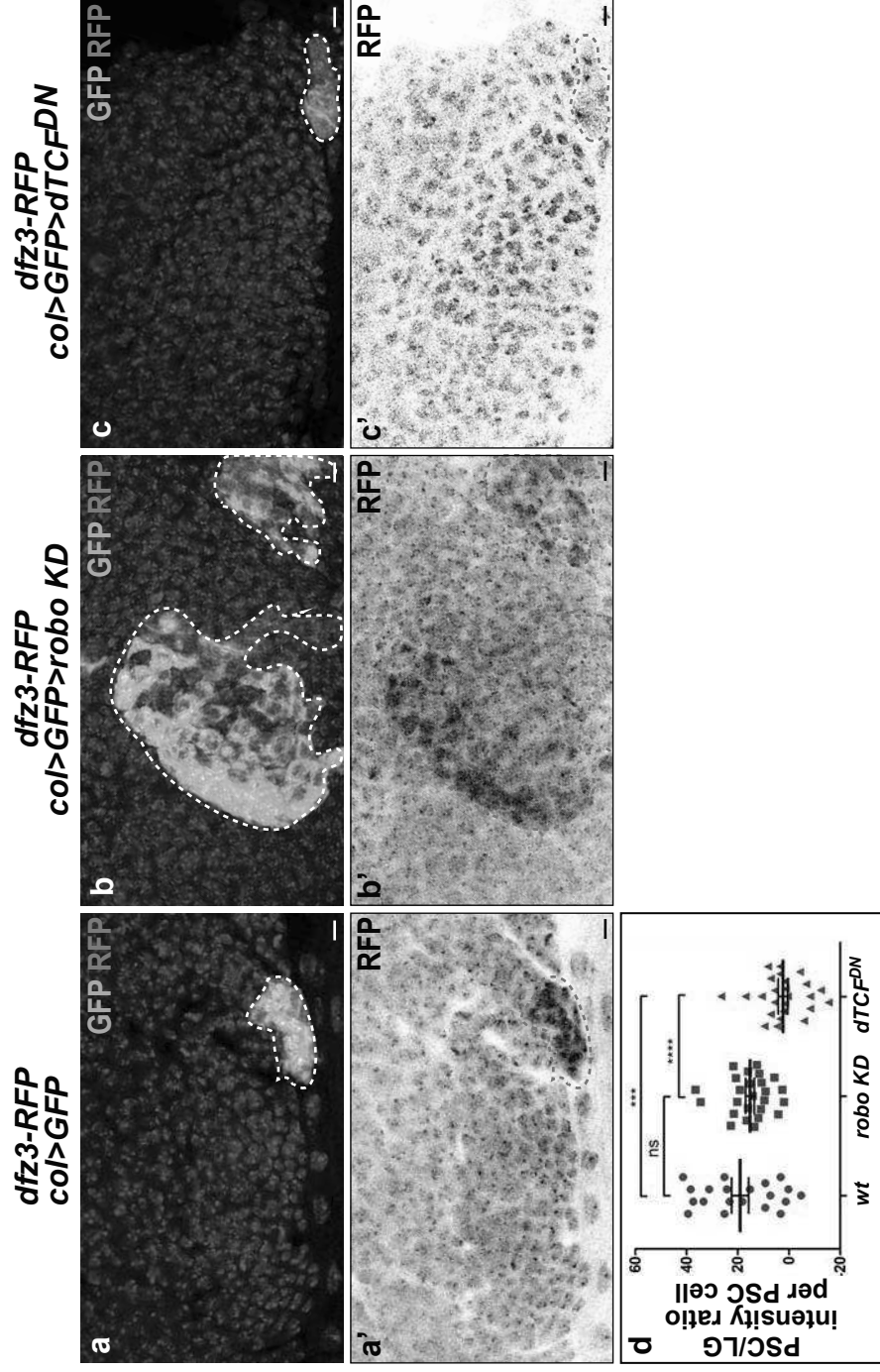
Supplementary Figure 3



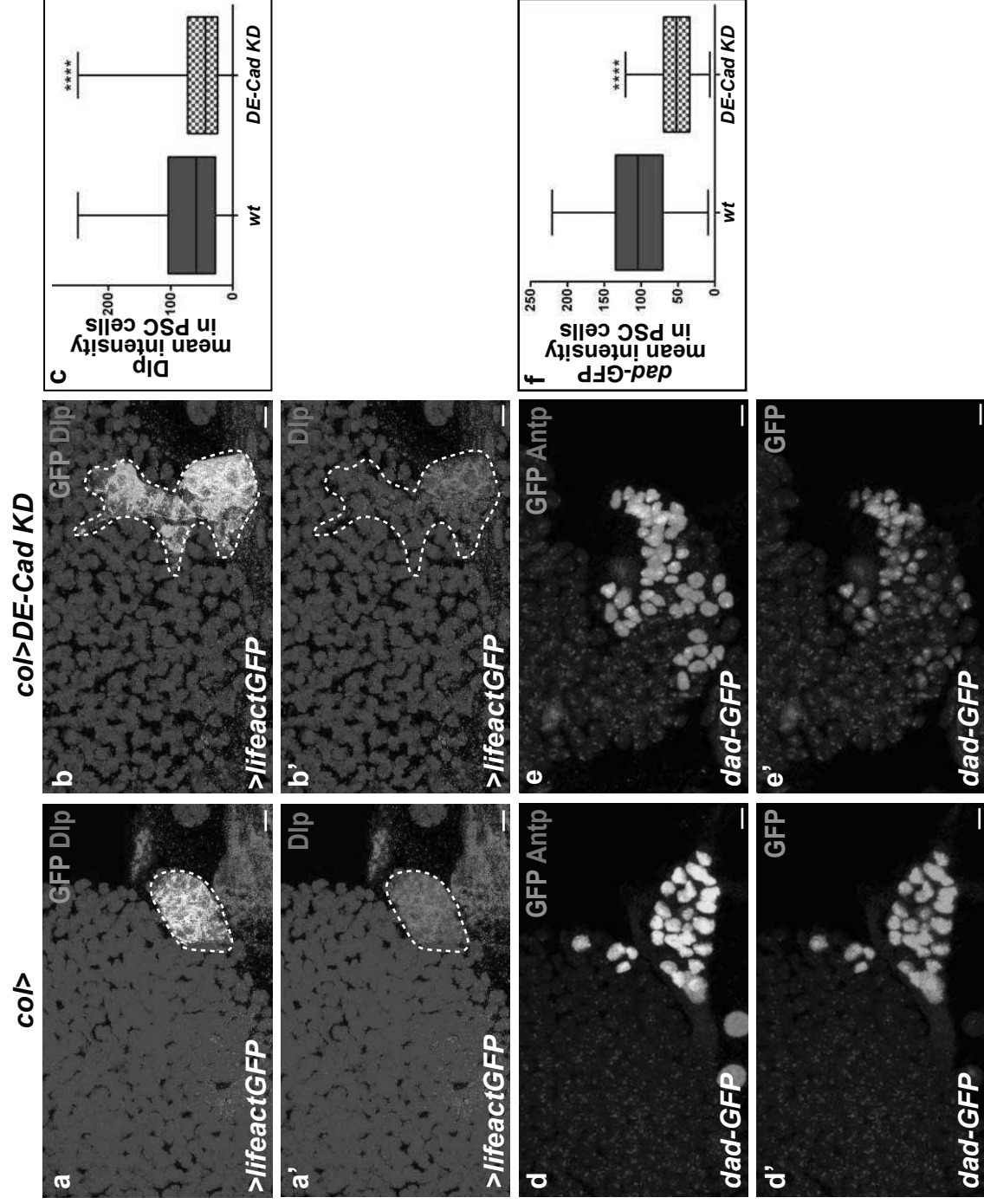
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 7

B) Article de vulgarisation : la « niche hématopoïétique » de la drosophile, un modèle d'étude *in vivo* du microenvironnement contrôlant les CSHs

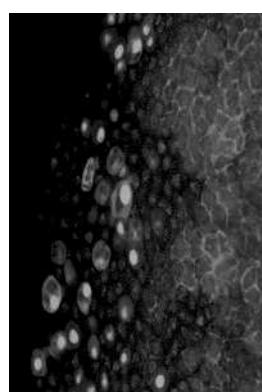
Au cours de ma thèse j'ai pu participer en tant que co-premier auteur à la rédaction d'un article de vulgarisation scientifique en français dans la revue Médecine et Science. Cet article a pour but de présenter l'organe hématopoïétique de la larve de drosophile en tant que modèle d'étude *in vivo* de l'hématopoïèse et de la « niche hématopoïétique ».

► Le maintien et la fonction des cellules souches qui assurent le renouvellement des tissus sont dépendants du microenvironnement de ces cellules, désigné par le terme « niche ». Chez les mammifères, plusieurs voies de signalisation ont été impliquées dans les communications entre les cellules souches hématopoïétiques et leur niche. Nos connaissances de ces communications restent cependant fragmentaires. La découverte chez la drosophile d'une niche hématopoïétique, le *posterior signaling center* (PSC), a ouvert de nouvelles possibilités d'études génétiques. Le nombre des cellules du PSC est déterminant pour l'homéostasie entre progéniteurs hématopoïétiques et cellules différenciées. Le décryptage d'une cascade de signalisation contrôlant cette taille a établi de nouveaux parallèles entre la drosophile et les mammifères, et ouvert de nouvelles perspectives d'étude chez l'homme. ◀

La niche hématopoïétique de la drosophile

Un modèle d'étude *in vivo* du microenvironnement contrôlant les cellules souches hématopoïétiques

Ismaël Morin-Poulard, Isabelle Louradour, Nathalie Vanzo, Michèle Crozatier



Centre de biologie du développement, UMR 5547 CNRS/UPS, Toulouse III, 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 9, France. I. Morin-Poulard et I. Louradour ont contribué de façon équivalente à cet article. michele.crozatier-borde@univ-tlse3.fr

CSH [1-6] (Figure 1). Cependant, bien que le concept de niche ait été proposé dès 1978 [7], les relations fonctionnelles entre niches et CSH restent mal connues. La découverte d'une « niche hématopoïétique » chez la drosophile ouvre de nouvelles possibilités pour étudier *in vivo* comment le microenvironnement contrôlant l'autorenouvellement et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques est lui-même régulé.

La niche hématopoïétique des mammifères

Les cellules souches jouent un rôle essentiel pour le maintien de l'homéostasie des tissus adultes. L'utilisation des cellules souches, un des espoirs de la médecine régénératrice, nécessite d'identifier et de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans leur auto-renouvellement, leur prolifération et leur différenciation. Il est maintenant acquis que le microenvironnement cellulaire, appelé niche, joue un rôle essentiel dans le contrôle de ces processus. Chez l'homme adulte, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) résident dans la moelle osseuse où elles prolifèrent et se différencient en cellules des différents lignages sanguins : érythrocytaire, myéloïde, lymphoïde et mégacaryocytaire. Deux compartiments majeurs de la niche hématopoïétique sont la niche endostéale (proche de l'os) et la niche vasculaire, contenant différents types de cellules stromales sécrétant des facteurs solubles dans l'environnement des

Avantages du modèle drosophile pour des études *in vivo*

La majorité des gènes qui régulent l'hématopoïèse sont conservés au cours de l'évolution, de la drosophile aux vertébrés [8]. La redondance fonctionnelle entre gènes/protéines d'une même famille étant beaucoup moins importante chez la drosophile, ce modèle facilite les analyses fonctionnelles *in vivo* [9]. La drosophile présente aussi un temps de génération court et offre une panoplie de techniques génétiques sophistiquées. Enfin, alors que chez les vertébrés l'hématopoïèse adulte se situe dans la moelle osseuse, elle a lieu chez la drosophile dans un organe facilement accessible et manipulable *in vivo* : la glande lymphatique.

L'hématopoïèse chez la drosophile

L'hématopoïèse de la drosophile, à l'origine des cellules sanguines (appelées hémocytes chez les insectes), se déroule en deux vagues successives au cours du développement (pour revue voir [10,11]).

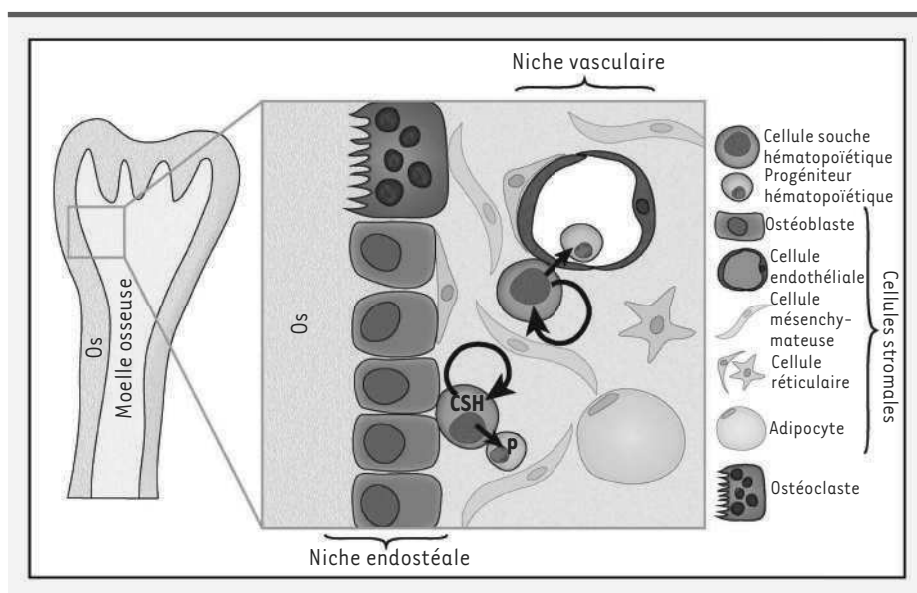


Figure 1. La niche hématopoïétique chez les mammifères. Chez les mammifères adultes, l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH, vert foncé) s'autorenouvellent (flèche) et donnent naissance aux progéniteurs hématopoïétiques (P, vert clair). Les cellules composant la niche, appelées cellules stromales, correspondent à différents types cellulaires. Deux compartiments majeurs de la niche hématopoïétique ont été identifiés et sont étroitement imbriqués : la niche endostéale, majoritairement composée d'ostéoblastes, et la niche vasculaire, correspondant aux petits vaisseaux sanguins [33].

- La première vague a lieu au stade embryonnaire à partir du mésoderme antérieur et est à l'origine de la spécification de deux types d'hémocytes circulants, apparentés au lignage myéloïde des vertébrés. Les plasmotocytes, équivalents fonctionnels des macrophages, sont impliqués dans la phagocytose. Les cellules à cristaux, fonctionnellement apparentées aux plaquettes, sont requises pour la cicatrisation et la mélanisation, une réaction spécifique aux arthropodes.
- La seconde vague d'hématopoïèse a lieu au stade larvaire dans un organe hématopoïétique dédié, appelé glande lymphatique. Outre des plasmotocytes et des cellules à cristaux, un troisième type cellulaire, les lamellocytes, se différencient dans la glande lymphatique en réponse à un stress immun, tel que l'infection par des guêpes parasitoïdes, parasites naturels des drosophiles. Les lamellocytes sont de grandes cellules très adhérentes, qui encapsulent et neutralisent un pathogène trop gros pour être détruit par phagocytose. La glande lymphatique se désagregge au début de la métamorphose et ses cellules sont libérées dans la circulation [12]. Ainsi, au cours de la métamorphose et dans les mouches adultes, l'hémolymph contient un mélange d'hémocytes d'origine embryonnaire et d'origine larvaire [13]. À ce jour, aucun processus hématopoïétique n'a été décrit au stade adulte.

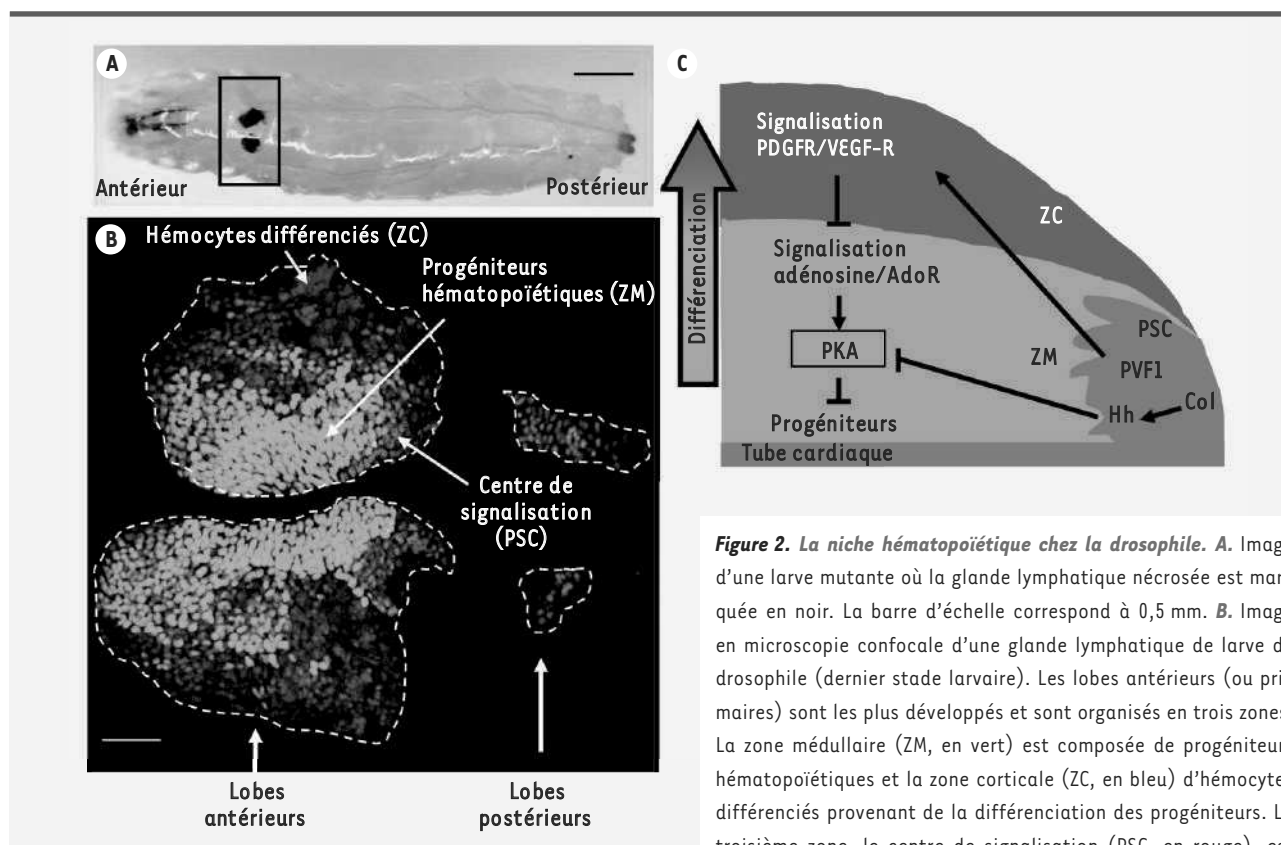
La glande lymphatique : l'organe hématopoïétique larvaire de la drosophile

La glande lymphatique se forme au cours de l'embryogenèse, au contact du tube cardiaque qui est le système vasculaire de la mouche (Figure 2A). Au cours des trois stades larvaires successifs (durée totale de 96 h), la glande lymphatique augmente de taille. Au dernier stade larvaire, la glande est mature et les hémocytes se différencient. À ce stade, la glande est composée de deux lobes antérieurs (ou primaires) formés au stade embryonnaire, et d'une suite de plus petits lobes postérieurs (ou secondaires) formés au cours des stades larvaires [14]. Ces lobes secondaires correspondent à des réservoirs de

progéniteurs hématopoïétiques (Figure 2B). Les lobes antérieurs comportent trois zones : la zone médullaire (ZM) qui contient les progéniteurs hématopoïétiques pluripotents ; la zone corticale (ZC), localisée au cortex de la glande, où se différencient les hémocytes ; et le PSC (*posterior signaling center*), un centre de signalisation localisé dans la partie postérieure et composé d'environ 30 cellules (Figure 2B) [15]. La spécification du PSC au cours de l'embryogenèse requiert la fonction du gène *collier* (*col*), qui code pour un facteur de transcription conservé au cours de l'évolution. Quatre gènes apparentés (orthologues) ont été identifiés chez les mammifères : les gènes *early B-cell factor* (*ebf*), dont deux, *ebf1* et *ebf2* sont impliqués dans l'hématopoïèse [16-19]. L'analyse de mutants *col* a permis de montrer que le PSC est requis pour maintenir un pool de progéniteurs hématopoïétiques pluripotents dans la glande lymphatique [20, 21], une fonction similaire à celle de la niche des CSH chez les vertébrés. Le PSC de drosophile constitue donc un modèle de choix, complémentaire du modèle de la souris, pour étudier *in vivo* les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la formation et la fonction de la niche hématopoïétique.

Les voies de signalisation impliquées dans la fonction du PSC

L'invalidation de gènes spécifiques du PSC ou de chacune des deux autres zones a montré que le PSC sécrète des signaux diffusibles, capables d'activer différentes voies de signalisation dans les autres compartiments de la glande lymphatique. Deux de ces signaux issus du PSC ont été bien caractérisés : le morphogène Hh



formée par un petit groupe de cellules localisées au pôle postérieur du lobe antérieur. Les cellules du centre de signalisation (PSC, en rouge) expriment le facteur de transcription Collier (Col). Les lobes postérieurs (ou secondaires) sont composés de progéniteurs hématopoïétiques et servent de réservoirs de cellules. La barre d'échelle correspond à 80 µm. **C.** Représentation schématique de la partie postérieure d'un lobe antérieur. Les cellules du PSC (rouge) envoient des signaux requis pour le maintien des progéniteurs de la ZM. Collier (Col) contrôle l'expression du morphogène Hedgehog (Hh) dans le PSC. Le ligand Hh diffuse et active la voie de signalisation Hh dans la ZM, qui est nécessaire au maintien de l'état progéniteur via la répression de la protéine kinase A (PKA). La voie de signalisation PDGF/VEGFR est activée dans la ZC grâce à la diffusion du ligand PVF1 synthétisé dans le PSC. L'activation de cette voie conduit à l'inactivation de la voie de signalisation adénosine/AdoR dans la ZM. Cette dernière contrôle positivement l'activité de PKA.

(hedgehog) et le ligand PVF1 (*platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor-like factor*) (Figure 2C). La perte de fonction dans le PSC des gènes *hh* ou *pvf1* conduit à la différenciation prématurée des progéniteurs hématopoïétiques. Cependant, les cibles et communications cellulaires de ces deux signaux sont très différentes. Hh agit directement sur les progéniteurs de la ZM et est nécessaire au maintien de leur état progéniteur pluripotent [21]. PVF1 diffuse par exocytose à partir du PSC et agit, via son récepteur PDGF/VEGFR, dans les hémocytes en cours de différenciation. Il y stimule la sécrétion d'ADGF-A (*adenosine deaminase-related growth factor-A*), une enzyme modifiant l'adénosine extracellulaire. Cette modification conduit à l'inactivation de la voie de signalisation adénosine/AdoR (*adenosine receptor*) dans les cellules de la ZM. La voie AdoR régule positivement l'activité de la protéine kinase A (PKA), favorisant la différenciation, alors que la signalisation Hh inhibe l'activité PKA dans la ZM. Le contrôle positif de l'activité PKA par les cellules se différenciant, via la voie adénosine/AdoR, et négatif par le PSC, via la voie Hh,

permet un maintien de l'équilibre entre progéniteurs et cellules différenciées [22]. D'autres études ont montré que la voie JAK (*Janus kinase*)/STAT (*signal transducer and activator of transcription*) est activée et nécessaire dans la ZM [23]. Ces données montrent que les communications entre le PSC et la ZM sont indispensables au maintien de l'équilibre entre cellules progéniteurs pluripotentes et cellules différenciées au sein de la glande lymphatique, et mettent en jeu de multiples voies de signalisation.

La voie de signalisation BMP/Dpp contrôle le nombre de cellules de la niche hématopoïétique chez la drosophile

La voie de signalisation BMP (*bone morphogenetic protein*), conservée au cours de l'évolution, est impliquée

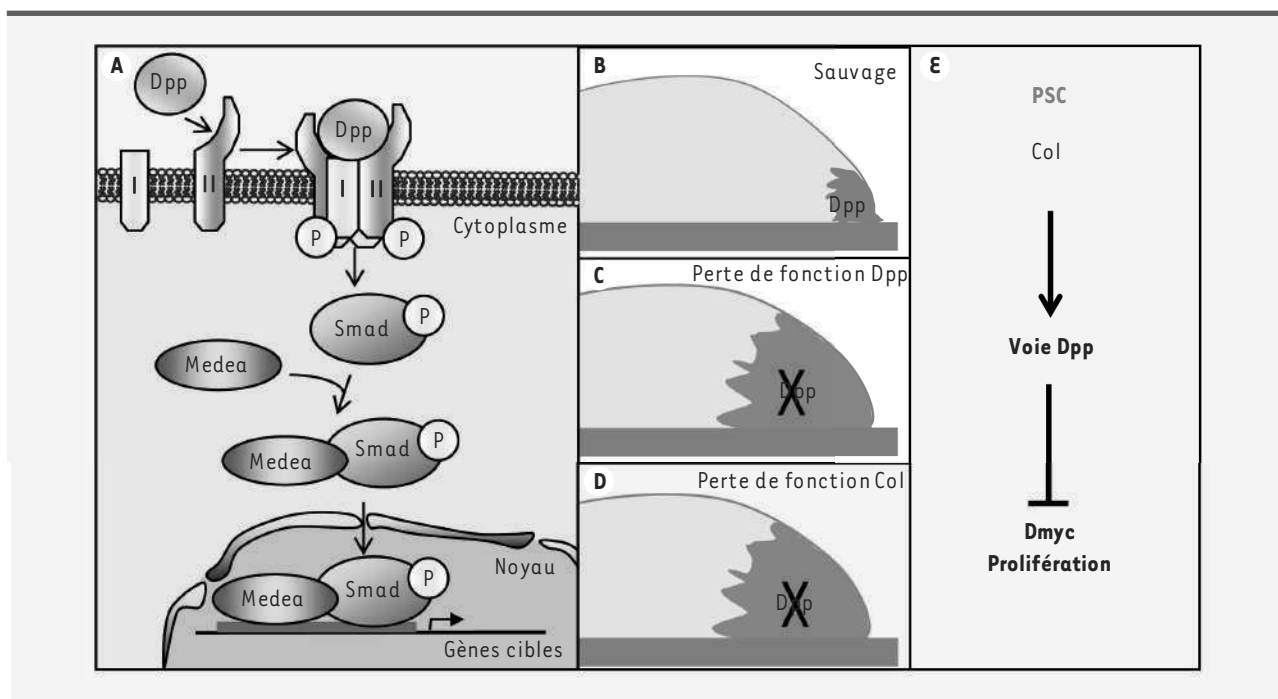


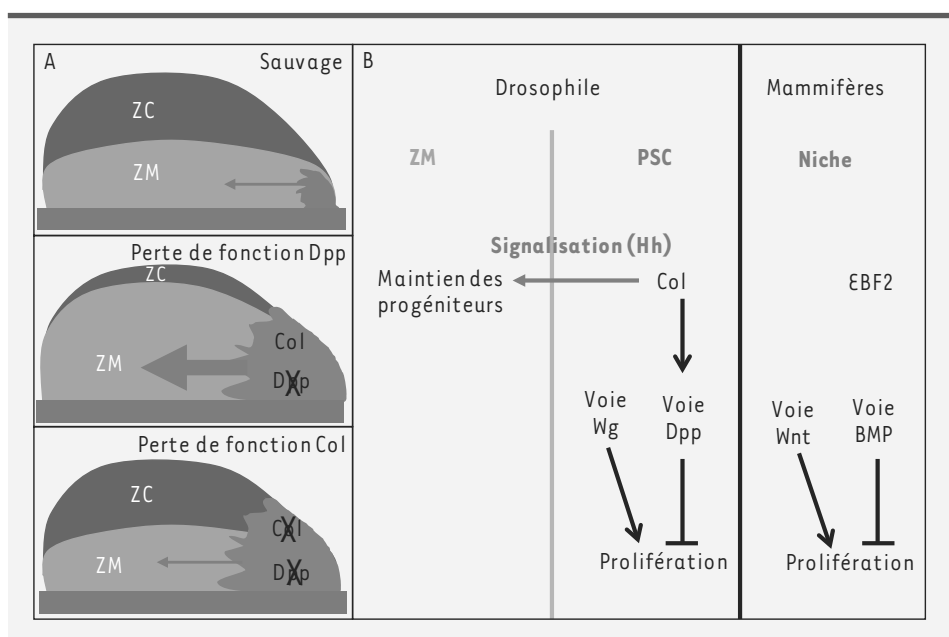
Figure 3. La voie de signalisation BMP/Dpp contrôle la taille du PSC. **A.** Le ligand Dpp se fixe sur le récepteur de type II, conduisant à la formation d'un complexe composé de récepteurs de type I et de type II. Ce complexe activé s'autophosphoryle et phosphoryle le facteur de transcription Smad. Smad phosphorylé recrute son cofacteur (Medea) et entre dans le noyau pour activer la transcription de gènes cibles. **B.** Au stade larvaire, la voie BMP/Dpp est activée dans le PSC (en rouge). L'inactivation dans le PSC de cette voie (**C.**) ou de *col* (**D.**) conduit à une augmentation massive du nombre de cellules composant le PSC. La perte de fonction de Col dans le PSC (**D.**) entraîne une inactivation de la voie BMP/Dpp dans ces cellules indiquant que Col contrôle l'activation de cette voie. **E.** Représentation schématique de la cascade de régulation contrôlant le nombre de cellules du PSC. L'activation de la voie BMP/Dpp par Collier dans le PSC réprime l'expression du proto-oncogène Myc (Dmyc chez la drosophile), impliqué dans la prolifération.

dans de nombreux processus biologiques [24–26]. Cette voie est activée suite à la liaison d'un ligand de type TGF β (*transforming growth factor* β) à un récepteur de type II, suivie du recrutement et de la phosphorylation d'un récepteur de type I. Le complexe récepteur type I plus II phosphorylé active par phosphorylation un facteur de transcription Smad (*mothers against decapentaplegic homolog*). Smad activé recrute un cofacteur, Smad4/Medea, puis devient nucléaire et active la transcription de ses gènes cibles (Figure 3A). Chez la drosophile, la voie BMP, appelée Dpp (*decapentaplegic*), comporte trois ligands (Dpp, *glass bottom boat* et *screw*), deux récepteurs de type I (*thickvein* [Tkv] et *saxophone*), deux récepteurs de type II (*wishful thinking* [Wit] et *Punt*), un transactivateur Smad et son cofacteur Medea [25]. Au sein de la glande lymphatique, la voie Dpp est spécifiquement activée dans le PSC par liaison de Dpp à ses récepteurs Tkv et Wit [27]. L'inactivation génétique de la signalisation Dpp dans le PSC conduit à une augmentation considérable du nombre de cellules du PSC, montrant que la voie Dpp contrôle la prolifération des cellules du PSC (Figure 3B). Ce contrôle de la prolifération passe par la répression de l'expression de Dmyc, l'orthologue chez la drosophile du proto-oncogène Myc vertébré (Figure 3E). Il a été montré indépendamment que la voie de signalisation *wingless* (Wg/Wnt) [28] régule positivement le nombre de cellules du PSC, suggérant que le rapport entre les

niveaux de signalisation Wnt et Dpp détermine la taille du PSC [27, 29]. L'étape suivante était de déterminer les conséquences du changement du nombre de cellules du PSC sur la différenciation des hémocytes (Figure 4A) [21, 27].

L'homéostasie des cellules au sein de la glande lymphatique est dépendante de la taille du PSC

L'inactivation de la signalisation Dpp dans le PSC induit à la fois une augmentation du nombre des cellules du PSC et une perte de différenciation des hémocytes, indiquant que le contrôle de la taille du PSC est un paramètre essentiel de l'homéostasie hémocytaire dans la glande lymphatique (Figure 4A). L'expression de Hh n'est cependant pas affectée dans ces conditions [21], ce qui suggère que l'augmentation du nombre de cellules du PSC provoque une augmentation de la quantité de Hh total produit, qui conduit au maintien de toutes les cellules de la LG (hors PSC) à l'état de progéniteurs multipotents [27]. Une perte de fonction de *col* dans le PSC à partir du deuxième



drosophile, Col contrôle à la fois l'expression du signal Hh et l'activation de la voie de signalisation BMP/Dpp. La signalisation Wg contrôle également le nombre de cellules de la niche. Cette étude révèle de nouveaux parallèles entre les rôles de Col, BMP/Dpp et Wg chez la drosophile et leurs orthologues mammifères EBF2, BMP et Wnt, dans le contrôle de l'hématopoïèse.

stade larvaire, après la phase de spécification dans l'embryon, conduit à une augmentation du nombre de cellules du PSC. Cette augmentation est corrélée à la perte d'activation de la voie BMP dans le PSC. Pourtant, contrairement à la simple inactivation de la voie Dpp, l'augmentation de la taille du PSC consécutive à l'absence de Col n'empêche pas la différenciation des hémocytes. D'où l'hypothèse que l'augmentation du nombre de cellules du PSC, en absence de Col, est compensée par une perte partielle de leur activité de signalisation (Figure 4). En accord avec cette hypothèse, l'expression de Hh dans les cellules du PSC est significativement diminuée dans des conditions de perte de fonction de Col. L'ensemble de ces données montre que le facteur de transcription Collier coordonne les programmes de prolifération et de signalisation des cellules de la niche hématopoïétique, et que cette coordination est un paramètre essentiel de l'hématopoïèse (Figure 4B).

De la drosophile aux mammifères

Bien que les données concernant la formation et la fonction de la niche hématopoïétique chez la drosophile et la souris restent fragmentaires, de nombreux parallèles peuvent déjà être établis entre ces deux organismes modèles. Ainsi, chez la souris, la perte de fonction du gène codant pour la β -caténine, facteur de transcription en aval de la voie Wg/Wnt, entraîne une diminution du nombre d'ostéoblastes [30]. Un phénotype comparable est observé chez la drosophile où l'inactivation du ligand Wg dans le PSC conduit à la réduction de la taille de ce dernier (Figure 4B) [27, 29]. Un second parallèle concerne l'implication de la voie BMP/Dpp requise pour le contrôle de la taille de

la niche chez la drosophile. En effet, l'inactivation d'un récepteur de la voie de signalisation BMP (BMPRI1A) dans les ostéoblastes conduit à une augmentation de leur nombre et, ainsi, du nombre de CSH [31]. Enfin, de nouveaux parallèles pourraient être établis sachant qu'EBF2 (*early B-cell factor 2*), l'un des orthologues murins de Col, est exprimé dans les ostéoblastes et est requis pour le maintien des CSH [32]. De la même manière, chez la drosophile, Col est requis pour le maintien des précurseurs hématopoïétiques. Cependant, le mécanisme impliqué demeure non élucidé et les interactions possibles entre EBF2 et les voies BMP et Wnt restent à établir. De même, une meilleure connaissance des voies de signalisation impliquées dans la communication entre la niche et les CSH chez les mammifères [33] permettra de déterminer si les voies de signalisation Hh et PDGF/VEGFR (*platelet derived growth factor/vascular endothelial growth factor*), impliquées dans ce processus chez la drosophile, jouent aussi un rôle dans la niche des vertébrés. ♦

SUMMARY

The drosophila hematopoietic niche

Stem cells are required for both tissue renewal and repair in response to injury. The maintenance and function of stem cells is controlled by their specific cellular microenvironment called "niche". Hematopoietic stem cells (HSC) that give rise to all blood cell types have

been extensively studied in mammals. Genetic and molecular analyses performed in mice identified several signaling pathways involved in the cellular communications between HSC and their niche. However, hematopoietic niche plasticity remains poorly understood. The discovery of a *Drosophila* hematopoietic niche, called PSC, established a new model to decipher the niche function *in vivo*. Size control of the PSC is essential to maintain hematopoietic tissue homeostasis and a molecular cascade controlling the PSC cell number has been characterized. Novel parallels between *Drosophila* and mammalian hematopoietic niches open new perspectives for studies of HSC biology in human. ♦

REMERCIEMENTS

Nous remercions L. Bataillé, J.L. Frendo, M. Meister et A. Vincent pour la lecture et la correction du manuscrit. Ce travail de recherche est financé par le CNRS, l'Université Toulouse III, le ministère de la Recherche (ANR-11 BSV2 00801), l'ARC (Association pour la recherche sur le cancer), la FRM (Fondation pour la recherche médicale ; DEQ 20090515429) et une bourse ARC pour I. Morin-Poulard.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES


1. Trumpp A, Essers M, Wilson A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 2010 ; 10 : 201-9.
2. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008 ; 132 : 598-611.
3. Levesque JP, Helwani FM, Winkler IG. The endosteal « osteoblastic » niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* 2010 ; 24 : 1979-92.
4. Lymperi S, Ferraro F, Scadden DT. The HSC niche concept has turned 31. Has our knowledge matured ? *Ann NY Acad Sci* 2010 ; 1192 : 12-8.
5. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol* 2012 ; 12 : 49-60.
6. Lataillade JJ, Brunet de la Grange P, Uzan G, Le Bousse-Kerdilès MC. Les cellules souches ont-elles l'âge de leur niche ? *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 582-5.
7. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978 ; 4 : 7-25.
8. Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev* 2007 ; 21 : 3044-60.
9. Andriatsilavo M, Gervais L, Fons C, Bardin AJ. L'intestin moyen de drosophile. Un nouveau modèle d'étude des cellules souches *in vivo*. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 75-81.
10. Crozatier M, Meister M. *Drosophila* haematopoiesis. *Cell Microbiol* 2007 ; 9 : 1117-26.
11. Lanot R, Zachary D, Holder F, Meister M. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 2001 ; 230 : 243-57.
12. Grigorian M, Mandal L, Hartenstein V. Hematopoiesis at the onset of metamorphosis: terminal differentiation and dissociation of the *Drosophila* lymph gland. *Dev Genes Evol* 2011 ; 221 : 121-31.
13. Holz A, Bossinger B, Strasser T, et al. The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 2003 ; 130 : 4955-62.

14. Krzemien J, Crozatier M, Vincent A. Ontogeny of the *Drosophila* larval hematopoietic organ, hemocyte homeostasis and the dedicated cellular immune response to parasitism. *Int J Dev Biol* 2010 ; 54 : 1117-25.
15. Jung SH, Evans CJ, Uemura C, Banerjee U. The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 2005 ; 132 : 2521-33.
16. Wang MM, Reed RR. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* 1993 ; 364 : 121-6.
17. Hagman J, Belanger C, Travis A, et al. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev* 1993 ; 7 : 760-73.
18. Hagman J, Gutch MJ, Lin H, Grosschedl R. EBF contains a novel zinc coordination motif and multiple dimerization and transcriptional activation domains. *EMBO J* 1995 ; 14 : 2907-16.
19. Daburon V, Mella S, Plouhinec JL, et al. The metazoan history of the COE transcription factors. Selection of a variant HLH motif by mandatory inclusion of a duplicated exon in vertebrates. *BMC Evol Biol* 2008 ; 8 : 131.
20. Krzemien J, Dubois L, Makki R, et al. Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 2007 ; 446 : 325-8.
21. Mandal L, Martinez-Agosto JA, Evans CJ, et al. A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* 2007 ; 446 : 320-4.
22. Mandal BC, Mukherjee T, Mandal L, et al. Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* 2011 ; 147 : 1589-600.
23. Makki R, Meister M, Penetier D, et al. A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response. *PLoS Biol* 2010 ; 8 : e1000441.
24. Harris RE, Ashe HL. Cease and desist: modulating short-range Dpp signalling in the stem-cell niche. *EMBO Rep* 2011 ; 12 : 519-26.
25. Affolter M, Basler K. The decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* 2007 ; 8 : 663-74.
26. Sagorny K, Chapellier M, Laperrousaz B, Maguer-Satta V. BMP et cancer : le Yin et le Yang des cellules souches. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 416-22.
27. Penetier D, Oyallon J, Morin-Poulard I, et al. Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 3389-94.
28. Gilgenkrantz H. Le monde selon YAP. Un dialogue perpétuel entre les voies Wnt et Hippo. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 868-74.
29. Sinenko SA, Mandal L, Martinez-Agosto JA, Banerjee U. Dual role of wingless signaling in stem-like hematopoietic precursor maintenance in *Drosophila*. *Dev Cell* 2009 ; 16 : 756-63.
30. Nemeth MJ, Mak KK, Yang Y, Bodine DM. Beta-catenin expression in the bone marrow microenvironment is required for long-term maintenance of primitive hematopoietic cells. *Stem Cells* 2009 ; 27 : 1109-19.
31. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003 ; 425 : 836-41.
32. Kieslinger M, Hiechinger S, Dobrev G, et al. Early B cell factor 2 regulates hematopoietic stem cell homeostasis in a cell-nonautonomous manner. *Cell Stem Cell* 2010 ; 7 : 496-507.
33. Wilson A, Laurenti E, Trumpp A. Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2009 ; 19 : 461-8.

TIRÉS À PART

M. Crozatier





Tarifs d'abonnement m/s - 2014


Abonnez-vous

à médecine/sciences

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement

page 110 dans ce numéro de m/s



Discussion

Discussion

I. Contrôle de la dispersion de la GL après parasitisme par des guêpes

A) Un réseau génétique complexe contrôle la dispersion de la GL

Au cours de ma thèse, l'axe majeur de ma recherche a été d'analyser la réponse de la GL au parasitisme par des guêpes. J'ai mis en évidence un réseau génétique contrôlant la dispersion de la GL suite au parasitisme, qui permet ainsi de relâcher les lamellocytes dans l'hémolymphe, où ils pourront encapsuler l'œuf de guêpe et le neutraliser. Ce réseau génétique fait intervenir les voies de signalisation Toll/NFκB et EGFR, ainsi que les ROS. Mes résultats indiquent en particulier qu'un haut niveau de ROS dans le PSC ainsi que l'expression de *spi* par ces cellules sont tous deux requis à la dispersion de la GL après parasitisme. Au sein de ce réseau, des interactions peuvent être discutées. Sinenko et col. (2012) proposent que lors de la réponse au parasitisme, l'augmentation du niveau de ROS dans le PSC contrôle le clivage du ligand Spi dans ces cellules. Spi peut alors diffuser et activer la voie EGFR dans les hémocytes en circulation, qui se différencient en lamellocytes pour permettre l'encapsulation de l'œuf de guêpe. Néanmoins dans cette étude aucun test fonctionnel d'épistasie entre les ROS et Spi n'a été réalisé en condition de parasitisme. La proposition selon laquelle l'activation par clivage de Spi est dépendante des ROS a été basée sur l'observation suivante : une augmentation du niveau de ROS dans le PSC réalisée en inhibant l'expression de l'enzyme de la chaîne respiratoire ND75 conduit à la présence ectopique de lamellocytes en circulation ; et la quantité de lamellocytes observée est fortement diminuée lorsque Spi est inhibé en même temps que ND75 dans le PSC. L'augmentation des ROS a ici été réalisée au moyen d'outils génétiques, et pourrait ne pas refléter ce qui se passe en condition de parasitisme. Il n'est ainsi pas exclu que les ROS et la voie EGFR agissent en fait en parallèle pour contrôler la dispersion de la GL et/ou l'encapsulation après parasitisme.

De plus, le phénotype de défaut de dispersion de la GL après parasitisme observé après inhibition de *spi* dans le PSC est peu pénétrant : alors que 86% des GLs contrôles sont dispersées et aucune n'est intacte, seulement 6% des GLs *antp>spi* KD sont totalement intactes, les GLs restantes étant dispersées ou en cours de dispersion. Le phénotype observé lors de l'inactivation de la voie EGFR dans la

ZM (*dome*>DER DN) est par contre beaucoup plus pénétrant car 31% sont toujours intacts 30H après parasitisme, comparé aux contrôles où aucune GL n'est intacte et 96% sont dispersées (cf résultats I). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats : 1) l'inhibition de *spi* dans le PSC est réalisée par RNAi. Le RNAi utilisé n'est peut-être pas assez efficace pour diminuer fortement l'expression de *spi* dans le PSC, conduisant à une condition hypomorphe. 2) Spi n'est pas le seul ligand de la voie EGFR. D'autres ligands pourraient être exprimés par le PSC et contribuer en plus de Spi à l'activation de la voie EGFR dans la ZM. Il serait intéressant de déterminer si Gurken et Vein, les deux autres ligands de la voie EGFR, sont impliqués dans la réponse au parasitisme.

Il reste également à intégrer la voie JAK/STAT dans le réseau génique contrôlant la dispersion de la GL après parasitisme. En effet, tout comme l'augmentation du niveau de ROS et l'activation des voies Toll/NFκB et EGFR, la voie JAK/STAT est nécessaire à la dispersion de la GL après parasitisme. Néanmoins, l'activité des voies JAK/STAT, Toll/NFκB et EGFR, ainsi qu'un haut niveau de ROS, sont requis à des temps différents. En effet, l'activation de la voie JAK/STAT dans la ZM est requise avant parasitisme, puis la voie est inactivée, contrairement aux voies Toll/NFκB et EGFR dont l'activation est nécessaire seulement après parasitisme, dans le PSC et la ZM, respectivement. L'augmentation du niveau de ROS est aussi requise uniquement après parasitisme. Les mécanismes permettant l'inhibition de la voie JAK/STAT dans la ZM après parasitisme, nécessaire à la production massive de lamellocytes et à la dispersion de la GL, n'ont pas été analysés. En particulier, il n'est pas exclu que l'augmentation du niveau de ROS dans le PSC et/ou l'activation de la voie EGFR dans la ZM puisse(nt) contrôler l'inhibition de la voie JAK/STAT dans la ZM. Enfin, on peut également envisager qu'une réactivation de la voie JAK/STAT dans les lamellocytes soit nécessaire à leur différenciation terminale ou à leur fonction, bien qu'aucun des rapporteurs décrits de l'activité JAK/STAT (10xStatGFP, DomeMESO-lacZ, DomeMESO-GFP) n'est exprimé dans ces cellules.

B) Le PSC est-il le seul acteur du contrôle de la dispersion des GLs ?

Mes travaux confirment le rôle primordial du PSC dans la GL pour permettre une réponse efficace contre le parasitisme par des guêpes (Crozatier et al., 2004; Krzemień et al., 2007; Sinenko et al., 2012). En particulier, l'activation de la voie Toll/NFκB dans le PSC suite au parasitisme est requise pour contrôler la dispersion de la GL (cf résultats I). En plus du PSC, la voie Toll/NFκB est également activée dans la ZM 6H après parasitisme, comme le montre l'expression du transgène D4-lacZ, rapporteur d'activité des facteurs de transcription Dif et Df. Déterminer si cette activation de la voie Toll/NFκB dans la ZM est impliquée dans la réponse au parasitisme reste à être élucidé. Une hypothèse est que cette activation dans les progéniteurs hématopoïétiques pourrait contribuer à leur différenciation en lamellocytes. Un point intéressant noté au cours de mes analyses est lié au phénotype observé lors de la surexpression de la voie Toll/NFκB dans le PSC en absence de parasitisme : l'expression du transgène UAS-Toll^{10B}, entraînant une activation constitutive de la voie, sous le contrôle du pilote d'expression spécifique du PSC *col-gal4* conduit à la différenciation de lamellocytes dans la GL. Cependant les lamellocytes sont localisés uniquement dans la ZC, la ZM étant présente dans ces GLs, qui ne se sont pas dispersées. Ainsi, la surexpression de Toll^{10B} dans le PSC ne permet pas de mimer le phénotype observé dans la GL en réponse au parasitisme par des guêpes. Ces observations indiquent que l'activation de la voie Toll/NFκB dans le PSC n'est pas suffisante pour permettre la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques de la ZM en lamellocytes, une fonction potentiellement remplie par l'activation de la voie Toll/NFκB dans la ZM. De façon générale, aucune des manipulations que j'ai pu réaliser dans le PSC, y compris la surexpression d'une forme clivée du ligand Spi, n'a permis la dispersion de la GL en absence de parasitisme. Il est donc possible que la dispersion de la GL après parasitisme soit régulée à la fois par des signaux provenant du PSC et de la ZM. La contribution de la ZM et la nature précise des signaux mis en jeu restent à être définie.

L'analyse de l'expression des ROS lors du parasitisme apporte un argument supplémentaire en faveur d'une contribution de la ZM dans le contrôle de la dispersion de la GL après parasitisme. En effet, une augmentation du niveau de ROS dans le PSC a été décrite 12H après parasitisme (Sinenko et al., 2012). En

reproduisant cette expérience, j'ai observé que le niveau de ROS est également fortement augmenté dans la ZM après parasitisme. Cette augmentation pourrait aussi contribuer au contrôle de la dispersion de la GL après parasitisme. De plus, il a été observé dans le laboratoire que l'inactivation spécifique dans le PSC du gène *puffyeye* (*puff*), codant pour une déubiquitylase, conduit à une augmentation du niveau de ROS dans le PSC, mais aussi dans la ZM, ainsi qu'à la différenciation de lamellocytes dans la GL (Anurag Sharma : données non publiées de l'équipe). J'ai également observé que supprimer l'augmentation des ROS dans le PSC en conditions de parasitisme (*col>catalase*) entraîne une diminution de l'expression du rapporteur du niveau de ROS GstD-lacZ à la fois dans le PSC et dans la ZM (cf résultats I). L'ensemble de ces résultats suggère qu'il existe en condition de parasitisme une régulation du niveau de ROS de la ZM par le PSC. La question des mécanismes impliqués dans cette régulation n'a pas encore été abordée dans le laboratoire et reste particulièrement intrigante.

En conclusion, le contrôle de la dispersion de la GL après parasitisme est complexe, et fait intervenir différents niveaux de régulation. Le PSC est un acteur majeur de ce contrôle, cependant d'autres intervenants, dont la ZM, pourraient également entrer en jeu.

C) Processus moléculaires impliqués dans la dispersion de la GL après parasitisme

La GL est entourée de matrice extra-cellulaire (MEC). Lors de la dispersion de la GL après parasitisme, la gaine de MEC entourant la GL est rompue, permettant le relâchement des lamellocytes dans la circulation lymphatique. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la dispersion de la GL suite au parasitisme ne sont à ce jour pas élucidés. La dispersion de la GL pourrait être due à un effet mécanique : les lamellocytes sont de très grosses cellules, et leur différenciation massive dans la GL pourrait entraîner une tension mécanique suffisante pour permettre l'éclatement de l'organe. Au cours de ma thèse, j'ai entrepris de mesurer la quantité de lamellocytes produits dans la GL après parasitisme. Pour cela j'ai utilisé le marqueur nucléaire Msn-GFP, exprimé dans les lamellocytes. Le problème est qu'une fois différenciés, les lamellocytes sont rapidement relâchés hors de la GL. La fenêtre de temps pendant laquelle des lamellocytes différenciés sont maintenus dans la GL est très courte, et varie d'une GL à l'autre. Je n'ai donc pas réussi à avoir une estimation fiable du nombre de lamellocytes présents dans la GL et à établir s'il existe une corrélation entre ce nombre et la dispersion de la GL après parasitisme. Néanmoins, bien qu'il n'ait pas été quantifié formellement, le nombre de lamellocytes observé dans les mutants *dif1* et *pll2/pll7* semble moindre par rapport aux contrôles. Il est donc tout à fait possible que le défaut de dispersion observé dans ces mutants soit dû à un nombre restreint de lamellocytes différenciés. De plus, un retard dans la différenciation des lamellocytes pourrait également contribuer au phénotype observé. Dans le mutant *dif1*, très peu de lamellocytes sont en effet observés 20H après parasitisme, contrairement aux GLs contrôles ; mais des lamellocytes sont clairement détectables plus tard, 30H après parasitisme, temps auquel les GLs contrôles sont dispersées.

Une autre hypothèse, non exclusive avec la précédente, est que les lamellocytes jouent un rôle actif dans la dispersion de la GL, en permettant la digestion de la MEC entourant l'organe. Les Métalloprotéases de la matrice (MMPs) sont des enzymes dont la fonction est de cliver les protéines de la MEC. Il existe deux MMPs chez la drosophile, MMP1 et MMP2 (Llano et al., 2002; Llano et al., 2000). Nous avons observé que MMP1-GFP, rapporteur d'expression de *mmp1*, ainsi que le pilote *mmp2-gal4* contrôlant l'expression de la GFP, sont exprimés dans les lamellocytes

présents dans la GL après parasitisme, suggérant que ces deux métalloprotéases pourraient être impliquées dans la digestion de la MEC entourant la GL (non publié). Déterminer si les MMPs sont requises dans les lamellocytes pour permettre la dispersion de la GL après parasitisme est en cours d'analyse.

II. Etablissement du transcriptome du PSC après parasitisme

L'approche de « TU-tagging » entreprise au début de ma thèse n'a pas permis d'établir le transcriptome des cellules du PSC à cause de nombreuses contraintes techniques, liées en particulier à la quantité de matériel disponible et au faible taux d'enrichissement en ARNs d'intérêt obtenu (cf résultats III). D'autres approches techniques ont été entreprises ou envisagées afin d'identifier le transcriptome des cellules du PSC. Outre un transcriptome réalisé avant mon arrivée à partir de GLs entières disséquées dans divers contextes génétiques, l'équipe a entrepris d'isoler les cellules du PSC du reste de la GL afin de réaliser leur transcriptome. Pour cela, l'approche envisagée était d'utiliser la Laser Capture Microdissection (LCM). Le principe de la LCM est d'isoler une population de cellules, marquées par l'expression d'un marqueur fluorescent tel que la GFP, au sein d'un tissu, en utilisant un laser qui déforme un film plastique très fin auquel vont rester collées les cellules d'intérêt (Bonner et al., 1997; Simone et al., 1998; Suarez-Quian et al., 1999). Malheureusement cette approche s'est avérée non adaptable à la GL.

L'équipe envisage à présent d'utiliser une technique basée sur l'utilisation de l'enzyme PolyA Binding Protein (PABP) (Roy et al., 2002; Yang et al., 2005). La PABP se lie à la queue polyA des ARN messagers. Le principe est d'exprimer une version étiquetée de cette enzyme dans les cellules d'intérêt, en l'occurrence celles du PSC, grâce au système UAS-Gal4. Les complexes ARNm/PABP sont ensuite « cross-linkés », puis immuno-précipités avec un anticorps dirigé contre l'étiquette portée par la PABP. Les ARNms présents dans ces complexes sont enfin isolés puis séquencés. Les premiers tests réalisés par l'équipe montrent que la surexpression continue de la PABP dans le PSC induit la formation de lamellocytes dans la GL. Comme pour le TU-tagging, l'homéostasie de la GL est altérée dans ces conditions. Il est envisageable d'exprimer la PABP dans le PSC pendant un temps restreint, en utilisant le système Gal4/Gal80ts. Des étapes de mise au point seront donc nécessaires à l'adaptation de cette technique pour établir le transcriptome du PSC.

Enfin, la dernière approche envisagée est de réaliser le transcriptome des cellules du PSC triées par FACS. Cette approche pose deux problèmes majeurs. Tout d'abord, le PSC est entouré d'une matrice extra-cellulaire particulièrement dense, et la dissociation des cellules de la GL et du PSC, qui doivent passer individuellement

dans l'appareil de FACS, devra être mise au point. De plus, la dissociation des cellules de l'organe hématopoïétique par trypsine, qui se fait sur cellules non fixées, pourrait en modifier le transcriptome.

Chacune des techniques envisageables pour établir le transcriptome des cellules du PSC possède des avantages et des biais. Des étapes de mise au point seront nécessaires pour chacune afin de pouvoir identifier le plus fidèlement possible le changement d'expression génique de ces cellules dans des conditions de parasitisme par des guêpes par rapport à des conditions « normales ».

III. La GL est-elle le site majeur de production des lamellocytes après parasitisme ?

A) Quelle est la contribution de la GL à la production globale de lamellocytes ?

Outre la GL, les compartiments sessiles sont également responsables de la production de lamellocytes en réponse au parasitisme par des guêpes. Markus et col. (2009) proposent que les compartiments sessiles, et non la GL, sont le site majeur de la production des lamellocytes en réponse au parasitisme (Márkus et al., 2009). En effet, en séparant par ligature les parties antérieure et postérieure de larves de drosophiles, les auteurs montrent que l'encapsulation des œufs de guêpes peut avoir lieu sans la contribution de la partie antérieure du corps de la larve, où se trouve la GL. Ils observent également que cette encapsulation peut avoir lieu alors que la GL n'est pas dispersée, et proposent donc que la GL n'a qu'un rôle mineur dans l'encapsulation des œufs de guêpe après parasitisme, le rôle principal étant tenu par les compartiments hématopoïétiques sessiles. Dans l'étude de Markus et col. (2009), ni le taux d'encapsulation des œufs de guêpe ni le succès du parasitisme n'a été quantifié. Un point important de cette étude est que l'ensemble des expériences de parasitisme a été réalisé à la température de 18°C. Au cours de mes expériences, j'ai été amenée à utiliser différentes conditions de température, pour permettre l'expression conditionnelle de gènes. J'ai observé qu'à 18°C, la GL de larves parasitées par des guêpes ne se disperse quasiment jamais, et les larves atteignent généralement le stade de la pupaison avec une GL intacte. Lors de mes tests d'inhibition conditionnelle, j'ai donc choisi de travailler à la température de 22°C et non de 18°C pour permettre l'éclatement de la GL chez les larves contrôles. Cette observation montre que la réponse au parasitisme par des guêpes varie en fonction de la température. A la température de 18°C, les hémocytes en circulation et non la GL sont donc la source principale de lamellocytes. La quantité de lamellocytes produits et/ou le temps nécessaire à leur production pourrai(en)t être altéré(s). Néanmoins à 25 ou 27°C, température à laquelle j'ai réalisé la majorité de mes expériences, la GL produit massivement des lamellocytes, qui sont ensuite libérés dans la circulation lymphatique et doivent certainement contribuer à l'encapsulation. Or, la réussite de la neutralisation de l'œuf de guêpe par encapsulation est une course contre la montre. En effet, si la réponse immunitaire est trop tardive, ou de

trop faible amplitude, l'œuf de guêpe éclot et donne naissance à une larve. La température semble donc modifier les paramètres de cette course, car elle ralentit la mise en place de la réponse immunitaire, mais potentiellement aussi le temps de développement de l'œuf de guêpe. Savoir si la résistance des larves de drosophile au parasitisme par des guêpes nécessite une production massive de lamellocytes par la GL reste donc une question ouverte. Une hypothèse est que les lamellocytes produits par les compartiments sessiles pourraient plus rapidement atteindre l'œuf de guêpe et ainsi agir précocement dans la formation de la capsule ; tandis que les lamellocytes produits dans la GL, libérés au moment de la dispersion de la GL, pourraient intervenir un peu plus tardivement et consolider la capsule. Selon cette hypothèse, la GL agirait en tant que réservoir de lamellocytes, permettant de produire ces cellules en grande quantité pour permettre une encapsulation efficace de l'œuf de guêpe. Cette hypothèse reste à ce jour non démontrée, et des analyses supplémentaires seront nécessaires pour déterminer la contribution relative des différents compartiments hématopoïétiques producteurs de lamellocytes à l'encapsulation des œufs de guêpe. Néanmoins, il est démontré que le PSC joue un rôle clé dans le contrôle de l'encapsulation des œufs de guêpe (Krzemień et al., 2007; Sinenko et al., 2012). Ceci suggère que la GL est effectivement cruciale à la réponse immunitaire au parasitisme.

B) Le PSC contrôle-t-il l'homéostasie des hémocytes présents dans la circulation lymphatique ?

Dans l'étude qui a établi que l'augmentation du niveau de ROS dans le PSC et le ligand Spi sécrété par le PSC sont requis après parasitisme pour permettre l'encapsulation des œufs de guêpes, les auteurs proposent que la voie EGFR est activée par Spi dans les hémocytes en circulation, qui se différencient alors en lamellocytes (Sinenko et al., 2012). Il est à noter que les lamellocytes différenciés présents dans la circulation lymphatique ont été observés 48H après parasitisme. A ce stade, la GL est complètement dispersée. Ces lamellocytes pourraient donc provenir du compartiment circulatoire, comme proposé dans cette publication, mais aussi de la GL. Les deux possibilités ne sont d'ailleurs pas mutuellement exclusives. Une autre situation suggère la capacité du PSC à contrôler la production de lamellocytes dans toute la larve. Dans un mutant nul *col*, aucun lamellocyte n'est détecté dans la circulation lymphatique après parasitisme (Crozatier et al., 2004). Col est requis à la spécification des cellules du PSC, et l'absence de lamellocytes observée dans le mutant *col* pourrait donc être due à l'absence de PSC. Cependant, il n'est pas clairement défini si l'absence de PSC est responsable de ce phénotype. Savoir si, en plus de son rôle dans le contrôle de l'homéostasie de la GL, le PSC contrôle également la prolifération et/ou la différenciation des hémocytes présents dans la circulation lymphatique lors d'un stress immun nécessite donc des analyses supplémentaires.

IV. Conclusion

L'infection de larves de drosophile par des guêpes parasitoïdes constitue un système modèle particulièrement intéressant pour étudier la réponse immunitaire cellulaire, mais aussi les changements hématopoïétiques faisant suite à une infection par un pathogène. Ainsi lors de ma thèse, j'ai étudié un type d'interaction hôte-pathogène, en me focalisant sur la réponse de l'hôte à la présence du pathogène. Lors d'une infection, l'hôte et l'organisme qui le contamine se livrent un combat sans merci. Ma thèse m'aura permis d'aborder ce processus fascinant, en utilisant un modèle original et des outils génétiques puissants. Outre la formation scientifique et technique que je retire de ces années, j'ai particulièrement apprécié de pouvoir étudier cette question biologique passionnante.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. Parties résultats I et II

La majorité des outils et protocoles utilisés sont décrits dans la partie « Materials and Methods » de l'article présenté dans la partie I de la section résultats. Ne seront détaillés ici que les outils et méthodes n'ayant pas été décrits dans cet article.

Lignées de drosophiles: en plus des lignées citées dans l'article, les souches suivantes ont été utilisées : UAS-Latran (Makki et al., 2010), UAS-Dome DN (=UAS-Dome Δ Cyt, (Brown et al., 2003), UAS-RNAi-*upd3* (Agaisse et al., 2003), *upd3-gal4* (Agaisse et al., 2003). La lignée UAS-Upd3 est un don de Yu-Chen Tsai (Institute of Genetics, National Yang-Ming University, Taipei; Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Republic of China). La lignée *domeMESO-gal4* a été générée dans notre équipe, en clonant une partie des séquences régulatrices de *dome* en amont de la séquence codante de *gal4*. Le mutant nul *upd3* provient du centre Bloomington (Δ upd3, BL 55728). La lignée *difVT-gal4* provient du centre VDRC (VDRC 208209).

Quantification de l'intensité d'expression de marqueurs: l'intensité d'expression du marqueur DomeMESO-GFP dans la ZM a été réalisée comme décrit dans l'article. L'intensité d'expression dans le PSC de la GFP sous le contrôle du pilote *upd3-gal4* a été réalisée de la même manière que pour l'intensité d'expression du transgène D4-lacZ dans le PSC (cf article).

II. Partie résultats III

Lignées de drosophiles: les lignées suivantes ont été utilisées : *col-gal4* et *dome-gal4* (Krzemień et al., 2007), Bc-GFP (Tokusumi et al., 2009), GstD-lacZ (Wang et al., 2003), deux lignées UAS-UPRT-HA, provenant du centre Bloomington (BL 27602 et 27604), *elav-gal4* (BL 8765). La lignée UAS-moe-RFP provient de Cédric Polesello (Centre de Biologie du Développement, Université Paul Sabatier / CNRS UMR 5547, Toulouse, France).

Marquage des ARNs par « TU-tagging » et extraction des ARNs : les croisements réalisés sont *col-gal4* x UAS-UPRT-HA pour le marquage des ARNs du PSC et *elav-gal4* x UAS-UPRT-HA pour le marquage des ARNs du cerveau. Les Drosophiles adultes ont été mises à pondre pendant 12 ou 24H à 25°C. Au stade eL3 ou mL3 (selon le type d'expérience), les larves ont été transférées sur milieu nutritif « Mocha » (20mL H₂O, 0,4g de sucrose, 0,18g d'agar, 1g de D-glucose, 0,5g de levure de bière inactivée), auquel a été ajouté ou non du 4TU (Sigma-Aldrich) à la concentration finale de 0,2mM ou 0,5mM. Les larves sont placées à 29°C pendant toute la durée de l'ingestion de 4TU, variant de 8 à 16H selon l'expérience. Les larves ont ensuite été disséquées en mL3, et les ARNs ont été extraits à partir de 25 à 100 GLs (selon le type d'expérience) ou de 10 cerveaux disséqué(e)s, selon un protocole préalablement décrit (Pennetier et al., 2012) en utilisant du Trizol reagent (life technologies).

Recherche de conditions de « TU-tagging » compatibles avec le maintien de l'homéostasie de la GL : le marquage des ARNs du PSC a été réalisé selon le protocole décrit ci-dessus. Après l'ingestion de 4TU, les larves ont été replacées sur un milieu nutritif classique ne contenant pas de 4TU, à la température de 22°C (ceci afin de laisser le temps à une éventuelle différenciation de lamellocytes). Les larves ont ensuite été disséquées en mL3, et des immunodétections ont été réalisées, selon le protocole décrit précédemment (Krzemien et al., 2010; Pennetier et al., 2012). Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-HA de souris (1/1000, Covance), anti- α -PS4 (lamellocytes) de lapin et anti-Col (PSC) de souris (respectivement 1/200 et 1/100,

Krzemien et al., 2007), anti- β gal de poulet (1/1000, Abcam). Les noyaux sont visualisés grâce au Topro3 (Thermo Fisher Scientific).

Vérification de la présence d'ARNs marqués dans la GL : les ARNs extraits de GLs après marquage des ARNs du PSC ont été biotinylés *in vitro* en utilisant l'EZ-link biotin-HPDP (Pierce), selon le protocole décrit (Cleary, 2008). La détection de la présence d'ARNs marqués a été réalisée en « dot-blot » : 300ng d'ARNs ont été déposés sur une membrane de nylon (Amersham N+), puis ont été « cross-linkés » à la membrane par cuisson (2H à 80°C). La membrane a été incubée 30min dans une solution de blocage (blot blocking solution : 125mM NaCl, 17mM Na₂HPO₄, 7,3mM NaH₂PO₄, 1%SDS), puis 5min avec une solution de streptavidine-HRP (1/5000 dans la blot blocking solution). 2 lavages de 20min ont ensuite été effectués (blot wash solution 1 : blot blocking solution diluée au 1/10), puis 2 lavages de 5min (blot wash solution 2 : 10mM Tris, 10mM NaCl, 2,1mM MgCl₂, pH 9,5). La révélation des complexes streptavidine-biotine a été réalisée en utilisant du DAB (Sigma-Aldrich). Le DAB à une concentration initiale de 330mg/mL a été dilué au ¼ dans du PBS + Tween 0,3%, puis de l'H₂O₂ a été ajouté à une concentration finale de 0,0015%, ainsi que 8 μ L de NiSO₄ pour 1mL de DAB. La membrane a été incubée dans la solution de DAB ainsi obtenue, pendant quelques minutes jusqu'à obtention d'une coloration. Plusieurs lavages PBS + Tween 0,3% ont permis d'arrêter la réaction. L'expérience de vérification de la présence d'ARNs marqués dans la GL par « dot-blot » a été répétée plusieurs fois.

Purification des ARNs étiquetés et quantification relative des ARNs : les ARNs de GLs ou de cerveaux ont été marqués, extraits, puis biotinylés *in vitro* comme décrit précédemment. Pour les échantillons de cerveau, un ARN exogène *β tubuline* a été synthétisé par transcription *in vitro*, puis ajouté à la préparation d'ARNs de cerveaux. Des RT-PCR quantitatives ont été réalisées à partir de 100ng d'ARNs des fractions « avant billes » et « non retenue », et à partir de la totalité des ARNs de la fraction « éluée », afin de mesurer les quantités relatives des ARNs *elav* et *β tub*. Pour les échantillons de GLs, des RT-PCR quantitatives ont été réalisées à partir de 100ng d'ARNs de la fraction « avant billes » et à partir de la totalité des ARNs

obtenus dans la fraction « éluée », afin de mesurer les quantités relatives des ARNs *antp* et *tep4*. La Superscript Reverse Transcriptase (Invitrogen) a été utilisée pour la réverse transcription, ainsi qu'un oligo dT comme amorce. La PCR quantitative a été réalisée sur un appareil « MyiQ single color real time PCR » (Biorad). Les amorces PCR utilisées sont les suivantes :

elav: 5'GCTCCGGTATTTGCCATAATAAAG3' et 5'GTTCGCTTTGTTTGTCCAGCC3'

βtub:5'GCGACTGTATTAGTGGAGTTCTGTATTC3'et 5'CAAATGAGTGCGATCTGTGAAG3'

antp: 5'CCAGGGTCCTCCACAGATGCACC3' et 5'CATGCGCCGATTCTGGAACC3'

tep4: 5' GTGTGCGGTTGGTGGAAAC3' et 5'CACCGCATGTGTTCTGTACG3'.

Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- Agaisse, H., Petersen, U.M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., and Perrimon, N. (2003). Signaling role of hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-dependent response to septic injury. *Dev Cell* 5, 441-450.
- Al-Drees, M.A., Yeo, J.H., Boumelhem, B.B., Antas, V.I., Brigden, K.W., Colonne, C.K., and Fraser, S.T. (2015). Making Blood: The Haematopoietic Niche throughout Ontogeny. *Stem Cells Int* 2015, 571893.
- Anthony, B.A., and Link, D.C. (2014). Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol* 35, 32-37.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118, 149-161.
- Asgari, S., and Rivers, D.B. (2011). Venom proteins from endoparasitoid wasps and their role in host-parasite interactions. *Annu Rev Entomol* 56, 313-335.
- Avadhanula, V., Weasner, B.P., Hardy, G.G., Kumar, J.P., and Hardy, R.W. (2009). A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the Imd pathway in arthropod antiviral response. *PLoS Pathog* 5, e1000582.
- Bajgar, A., KucEROVA, K., Jonatova, L., Tomcala, A., Schneedorferova, I., Okrouhlik, J., and Dolezal, T. (2015). Extracellular adenosine mediates a systemic metabolic switch during immune response. *PLoS Biol* 13, e1002135.
- Baldrige, M.T., King, K.Y., Boles, N.C., Weksberg, D.C., and Goodell, M.A. (2010). Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature* 465, 793-797.
- Ballard, M.S., and Hinck, L. (2012). A roundabout way to cancer. *Adv Cancer Res* 114, 187-235.
- Banerjee, D., Liou, H.C., and Sen, R. (2005). c-Rel-dependent priming of naive T cells by inflammatory cytokines. *Immunity* 23, 445-458.
- Bataillé, L., Augé, B., Ferjoux, G., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2005). Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors. *Development* 132, 4635-4644.
- Becker, T., Loch, G., Beyer, M., Zinke, I., Aschenbrenner, A.C., Carrera, P., Inhester, T., Schultze, J.L., and Hoch, M. (2010). FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature* 463, 369-373.
- Benmimoun, B., Polesello, C., Haenlin, M., and Waltzer, L. (2015). The EBF transcription factor Collier directly promotes *Drosophila* blood cell progenitor maintenance independently of the niche. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 9052-9057.
- Benmimoun, B., Polesello, C., Waltzer, L., and Haenlin, M. (2012). Dual role for Insulin/TOR signaling in the control of hematopoietic progenitor maintenance in *Drosophila*. *Development* 139, 1713-1717.
- Bidla, G., Dushay, M.S., and Theopold, U. (2007). Crystal cell rupture after injury in *Drosophila* requires the JNK pathway, small GTPases and the TNF homolog Eiger. *J Cell Sci* 120, 1209-1215.
- Binggeli, O., Neyen, C., Poidevin, M., and Lemaitre, B. (2014). Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. *PLoS Pathog* 10, e1004067.
- Blyth, K., Cameron, E.R., and Neil, J.C. (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 376-387.

- Boettcher, S., Gerosa, R.C., Radpour, R., Bauer, J., Ampenberger, F., Heikenwalder, M., Kopf, M., and Manz, M.G. (2014). Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. *Blood* 124, 1393-1403.
- Boettcher, S., Ziegler, P., Schmid, M.A., Takizawa, H., van Rooijen, N., Kopf, M., Heikenwalder, M., and Manz, M.G. (2012). Cutting edge: LPS-induced emergency myelopoiesis depends on TLR4-expressing nonhematopoietic cells. *J Immunol* 188, 5824-5828.
- Boman, H.G., Nilsson, I., and Rasmuson, B. (1972). Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* 237, 232-235.
- Bonner, R.F., Emmert-Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S., and Liotta, L.A. (1997). Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 278, 1481,1483.
- Bray, S. (1998). Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway. *Semin Cell Dev Biol* 9, 591-597.
- Brennan, C.A., Delaney, J.R., Schneider, D.S., and Anderson, K.V. (2007). Psidin is required in *Drosophila* blood cells for both phagocytic degradation and immune activation of the fat body. *Curr Biol* 17, 67-72.
- Bretscher, A.J., Honti, V., Binggeli, O., Burri, O., Poidevin, M., Kurucz, É., Zsámboki, J., Andó, I., and Lemaitre, B. (2015). The Nimrod transmembrane receptor Eater is required for hemocyte attachment to the sessile compartment in *Drosophila melanogaster*. *Biol Open* 4, 355-363.
- Brown, S., Hu, N., and Hombría, J.C. (2003). Novel level of signalling control in the JAK/STAT pathway revealed by in situ visualisation of protein-protein interaction during *Drosophila* development. *Development* 130, 3077-3084.
- Broxmeyer, H.E. (2008). Chemokines in hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 15, 49-58.
- Broxmeyer, H.E., Lu, L., Platzer, E., Feit, C., Juliano, L., and Rubin, B.Y. (1983). Comparative analysis of the influences of human gamma, alpha and beta interferons on human multipotential (CFU-GEMM), erythroid (BFU-E) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) progenitor cells. *J Immunol* 131, 1300-1305.
- Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J.L., Di Marco, F., French, L., and Tschopp, J. (1998). MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 273, 12203-12209.
- Calder, P.C. (2013). Feeding the immune system. *Proc Nutr Soc* 72, 299-309.
- Challen, G.A., Boles, N.C., Chambers, S.M., and Goodell, M.A. (2010). Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. *Cell Stem Cell* 6, 265-278.
- Charroux, B., and Royet, J. (2010). *Drosophila* immune response: From systemic antimicrobial peptide production in fat body cells to local defense in the intestinal tract. *Fly (Austin)* 4, 40-47.
- Chiu, H., and Govind, S. (2002). Natural infection of *D. melanogaster* by virulent parasitic wasps induces apoptotic depletion of hematopoietic precursors. *Cell Death Differ* 9, 1379-1381.
- Chute, J.P., Muramoto, G.G., Dressman, H.K., Wolfe, G., Chao, N.J., and Lin, S. (2006). Molecular profile and partial functional analysis of novel endothelial cell-derived growth factors that regulate hematopoiesis. *Stem Cells* 24, 1315-1327.

- Cleary, M.D. (2008). Cell type-specific analysis of mRNA synthesis and decay in vivo with uracil phosphoribosyltransferase and 4-thiouracil. *Methods Enzymol* **448**, 379-406.
- Cobas, M., Wilson, A., Ernst, B., Mancini, S.J., MacDonald, H.R., Kemler, R., and Radtke, F. (2004). Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J Exp Med* **199**, 221-229.
- Colinet, D., Cazes, D., Belghazi, M., Gatti, J.L., and Poirié, M. (2011). Extracellular superoxide dismutase in insects: characterization, function, and interspecific variation in parasitoid wasp venom. *J Biol Chem* **286**, 40110-40121.
- Colinet, D., Dubuffet, A., Cazes, D., Moreau, S., Drezen, J.M., and Poirié, M. (2009). A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. *Dev Comp Immunol* **33**, 681-689.
- Colinet, D., Mathé-Hubert, H., Allemand, R., Gatti, J.L., and Poirié, M. (2013). Variability of venom components in immune suppressive parasitoid wasps: from a phylogenetic to a population approach. *J Insect Physiol* **59**, 205-212.
- Colinet, D., Schmitz, A., Depoix, D., Crochard, D., and Poirié, M. (2007). Convergent use of RhoGAP toxins by eukaryotic parasites and bacterial pathogens. *PLoS Pathog* **3**, e203.
- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., and Léopold, P. (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* **114**, 739-749.
- Costa, A., Jan, E., Sarnow, P., and Schneider, D. (2009). The Imd pathway is involved in antiviral immune responses in *Drosophila*. *PLoS One* **4**, e7436.
- Crozatier, M., and Meister, M. (2007). *Drosophila* haematopoiesis. *Cell Microbiol* **9**, 1117-1126.
- Crozatier, M., Ubeda, J.M., Vincent, A., and Meister, M. (2004). Cellular immune response to parasitization in *Drosophila* requires the EBF orthologue *collier*. *PLoS Biol* **2**, E196.
- De Braekeleer, M., De Braekeleer, E., and Douet-Guilbert, N. (2015). Geographic/ethnic variability of chromosomal and molecular abnormalities in leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*, 1-10.
- de Bruin, A.M., Demirel, Ö., Hooibrink, B., Brandts, C.H., and Nolte, M.A. (2013). Interferon- γ impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. *Blood* **121**, 3578-3585.
- De Gregorio, E., Han, S.J., Lee, W.J., Baek, M.J., Osaki, T., Kawabata, S., Lee, B.L., Iwanaga, S., Lemaitre, B., and Brey, P.T. (2002). An immune-responsive Serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 581-592.
- De Gregorio, E., Spellman, P.T., Rubin, G.M., and Lemaitre, B. (2001). Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12590-12595.
- De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine* **74**, 181-189.
- Deddouche, S., Matt, N., Budd, A., Mueller, S., Kemp, C., Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Antoniewski, C., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2008). The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in *drosophila*. *Nat Immunol* **9**, 1425-1432.
- DiAngelo, J.R., Bland, M.L., Bambina, S., Cherry, S., and Birnbaum, M.J. (2009). The immune response attenuates growth and nutrient storage in *Drosophila* by reducing insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20853-20858.
- Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457-462.

- Dostert, C., Jouanguy, E., Irving, P., Troxler, L., Galiana-Arnoux, D., Hetru, C., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2005). The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of drosophila. *Nat Immunol* 6, 946-953.
- Dragojlovic-Munther, M., and Martinez-Agosto, J.A. (2012). Multifaceted roles of PTEN and TSC orchestrate growth and differentiation of Drosophila blood progenitors. *Development* 139, 3752-3763.
- Dragojlovic-Munther, M., and Martinez-Agosto, J.A. (2013). Extracellular matrix-modulated Heartless signaling in Drosophila blood progenitors regulates their differentiation via a Ras/ETS/FOG pathway and target of rapamycin function. *Dev Biol* 384, 313-330.
- Dubuffet, A., Doury, G., Labrousse, C., Drezen, J.M., Carton, Y., and Poirié, M. (2008). Variation of success of *Leptopilina boulardi* in *Drosophila yakuba*: the mechanisms explored. *Dev Comp Immunol* 32, 597-602.
- Duvic, B., Hoffmann, J.A., Meister, M., and Royet, J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during Drosophila larval hematopoiesis. *Curr Biol* 12, 1923-1927.
- Ehninger, A., and Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J Exp Med* 208, 421-428.
- Eslin, P., and Prévost, G. (2000). Racing against host's immunity defenses: a likely strategy for passive evasion of encapsulation in *Asobara tabida* parasitoids. *J Insect Physiol* 46, 1161-1167.
- Esplin, B.L., Shimazu, T., Welner, R.S., Garrett, K.P., Nie, L., Zhang, Q., Humphrey, M.B., Yang, Q., Borghesi, L.A., and Kincade, P.W. (2011). Chronic exposure to a TLR ligand injures hematopoietic stem cells. *J Immunol* 186, 5367-5375.
- Essers, M.A., Offner, S., Blanco-Bose, W.E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M.A., and Trumpp, A. (2009). IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 458, 904-908.
- Fleming, H.E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K.M., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* 2, 274-283.
- Flores-Saaib, R.D., Jia, S., and Courey, A.J. (2001). Activation and repression by the C-terminal domain of Dorsal. *Development* 128, 1869-1879.
- Fossett, N., Hyman, K., Gajewski, K., Orkin, S.H., and Schulz, R.A. (2003). Combinatorial interactions of serpent, lozenge, and U-shaped regulate crystal cell lineage commitment during Drosophila hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11451-11456.
- Franc, N.C., Heitzler, P., Ezekowitz, R.A., and White, K. (1999). Requirement for croquemort in phagocytosis of apoptotic cells in Drosophila. *Science* 284, 1991-1994.
- Fuwa, T.J., Kinoshita, T., Nishida, H., and Nishihara, S. (2015). Reduction of T antigen causes loss of hematopoietic progenitors in Drosophila through the inhibition of filopodial extensions from the hematopoietic niche. *Dev Biol* 401, 206-219.
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. *Nat Immunol* 7, 590-597.
- Ganesan, S., Aggarwal, K., Paquette, N., and Silverman, N. (2011). NF- κ B/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster*. *Curr Top Microbiol Immunol* 349, 25-60.
- Ghosh, S., and Hayden, M.S. (2008). New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8, 837-848.

- Ghosh, S., Singh, A., Mandal, S., and Mandal, L. (2015). Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. *Dev Cell* 33, 478-488.
- Grigorian, M., Liu, T., Banerjee, U., and Hartenstein, V. (2013). The proteoglycan Trol controls the architecture of the extracellular matrix and balances proliferation and differentiation of blood progenitors in the *Drosophila* lymph gland. *Dev Biol* 384, 301-312.
- Guan, R., Malchiodi, E.L., Wang, Q., Schuck, P., and Mariuzza, R.A. (2004). Crystal structure of the C-terminal peptidoglycan-binding domain of human peptidoglycan recognition protein Ialpha. *J Biol Chem* 279, 31873-31882.
- Gueguen, G., Kalamarz, M.E., Ramroop, J., Uribe, J., and Govind, S. (2013). Polydnviral ankyrin proteins aid parasitic wasp survival by coordinate and selective inhibition of hematopoietic and immune NF-kappa B signaling in insect hosts. *PLoS Pathog* 9, e1003580.
- Hartenstein, V. (2006). Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 677-712.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). NF-kB in immunobiology. *Cell Res* 21, 223-244.
- Helenius, I.T., and Beitel, G.J. (2008). The first "Slit" is the deepest: the secret to a hollow heart. *J Cell Biol* 182, 221-223.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., *et al.* (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (2009). NF-kappaB in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000232.
- Holz, A., Bossinger, B., Strasser, T., Janning, W., and Klapper, R. (2003). The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 130, 4955-4962.
- Hombria, J.C., and Brown, S. (2002). The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr Biol* 12, R569-575.
- Honti, V., Csordás, G., Kurucz, É., Márkus, R., and Andó, I. (2014). The cell-mediated immunity of *Drosophila melanogaster*: hemocyte lineages, immune compartments, microanatomy and regulation. *Dev Comp Immunol* 42, 47-56.
- Honti, V., Csordás, G., Márkus, R., Kurucz, E., Jankovics, F., and Andó, I. (2010). Cell lineage tracing reveals the plasticity of the hemocyte lineages and of the hematopoietic compartments in *Drosophila melanogaster*. *Mol Immunol* 47, 1997-2004.
- Honti, V., Kurucz, E., Csordás, G., Laurinyecz, B., Márkus, R., and Andó, I. (2009). In vivo detection of lamellocytes in *Drosophila melanogaster*. *Immunol Lett* 126, 83-84.
- Horn, L., Leips, J., and Starz-Gaiano, M. (2014). Phagocytic ability declines with age in adult *Drosophila* hemocytes. *Aging Cell* 13, 719-728.
- Hosokawa, K., Arai, F., Yoshihara, H., Iwasaki, H., Nakamura, Y., Gomei, Y., and Suda, T. (2010). Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood* 116, 554-563.
- Hwang, R.Y., Zhong, L., Xu, Y., Johnson, T., Zhang, F., Deisseroth, K., and Tracey, W.D. (2007). Nociceptive neurons protect *Drosophila* larvae from parasitoid wasps. *Curr Biol* 17, 2105-2116.
- Irving, P., Ubeda, J.M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C., and Meister, M. (2005). New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cell Microbiol* 7, 335-350.

- Iwasaki, H., and Akashi, K. (2007). Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* 26, 726-740.
- Jiang, Y., Bonig, H., Ulyanova, T., Chang, K., and Papayannopoulou, T. (2009). On the adaptation of endosteal stem cell niche function in response to stress. *Blood* 114, 3773-3782.
- Jung, S.H., Evans, C.J., Uemura, C., and Banerjee, U. (2005). The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development* 132, 2521-2533.
- Kacsoh, B.Z., Lynch, Z.R., Mortimer, N.T., and Schlenke, T.A. (2013). Fruit flies medicate offspring after seeing parasites. *Science* 339, 947-950.
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124, 407-421.
- Keebaugh, E.S., and Schlenke, T.A. (2014). Insights from natural host-parasite interactions: the *Drosophila* model. *Dev Comp Immunol* 42, 111-123.
- Khadilkar, R.J., Rodrigues, D., Mote, R.D., Sinha, A.R., Kulkarni, V., Magadi, S.S., and Inamdar, M.S. (2014). ARF1-GTP regulates Asrij to provide endocytic control of *Drosophila* blood cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 4898-4903.
- Kiel, M.J., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., and Morrison, S.J. (2005). Spatial differences in hematopoiesis but not in stem cells indicate a lack of regional patterning in definitive hematopoietic stem cells. *Dev Biol* 283, 29-39.
- Kingsolver, M.B., Huang, Z., and Hardy, R.W. (2013). Insect antiviral innate immunity: pathways, effectors, and connections. *J Mol Biol* 425, 4921-4936.
- Kocks, C., Cho, J.H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A.M., Meister, M., Strom, C., Conto, S.L., Hetru, C., Stuart, L.M., *et al.* (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell* 123, 335-346.
- Kondo, M., Scherer, D.C., King, A.G., Manz, M.G., and Weissman, I.L. (2001). Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 11, 520-526.
- Konrad, L., Becker, G., Schmidt, A., Klöckner, T., Kaufer-Stillger, G., Dreschers, S., Edström, J.E., and Gateff, E. (1994). Cloning, structure, cellular localization, and possible function of the tumor suppressor gene lethal(3)malignant blood neoplasm-1 of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 163, 98-111.
- Krzemien, J., Oyallon, J., Crozatier, M., and Vincent, A. (2010). Hematopoietic progenitors and hemocyte lineages in the *Drosophila* lymph gland. *Dev Biol* 346, 310-319.
- Krzemień, J., Dubois, L., Makki, R., Meister, M., Vincent, A., and Crozatier, M. (2007). Control of blood cell homeostasis in *Drosophila* larvae by the posterior signalling centre. *Nature* 446, 325-328.
- Kubota, K., Keith, F.J., and Gay, N.J. (1993). Relocalization of *Drosophila* dorsal protein can be induced by a rise in cytoplasmic calcium concentration and the expression of constitutively active but not wild-type Toll receptors. *Biochem J* 296 (Pt 2), 497-503.
- Kulkarni, V., Khadilkar, R.J., Magadi, S.S., Srivathsa, M.S., and Inamdar, M.S. (2011). Asrij maintains the stem cell niche and controls differentiation during *Drosophila* lymph gland hematopoiesis. *PLoS One* 6, e27667.
- Kunisaki, Y., Bruns, I., Scheiermann, C., Ahmed, J., Pinho, S., Zhang, D., Mizoguchi, T., Wei, Q., Lucas, D., Ito, K., *et al.* (2013). Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 502, 637-643.
- Kunisaki, Y., and Frenette, P.S. (2014). Influences of vascular niches on hematopoietic stem cell fate. *Int J Hematol* 99, 699-705.

- Kurant, E., Axelrod, S., Leaman, D., and Gaul, U. (2008). Six-microns-under acts upstream of Draper in the glial phagocytosis of apoptotic neurons. *Cell* 133, 498-509.
- Kurucz, E., Márkus, R., Zsámboki, J., Folkl-Medzihradsky, K., Darula, Z., Vilmos, P., Udvardy, A., Krausz, I., Lukacsovich, T., Gateff, E., *et al.* (2007). Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Curr Biol* 17, 649-654.
- Labrosse, C., Stasiak, K., Lesobre, J., Grangeia, A., Huguet, E., Drezen, J.M., and Poirie, M. (2005). A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochem Mol Biol* 35, 93-103.
- Lam, B.S., and Adams, G.B. (2010). Hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow stem cell niche. *Int J Lab Hematol* 32, 551-558.
- Lam, V., Tokusumi, T., Tokusumi, Y., and Schulz, R.A. (2014). bantam miRNA is important for *Drosophila* blood cell homeostasis and a regulator of proliferation in the hematopoietic progenitor niche. *Biochem Biophys Res Commun* 453, 467-472.
- Lamiab, O., and Imler, J.L. (2014). Induced antiviral innate immunity in *Drosophila*. *Curr Opin Microbiol* 20, 62-68.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev Biol* 230, 243-257.
- Lapidot, T., and Petit, I. (2002). Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 30, 973-981.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2000). Specification of *Drosophila* hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 288, 146-149.
- Lebestky, T., Jung, S.H., and Banerjee, U. (2003). A Serrate-expressing signaling center controls *Drosophila* hematopoiesis. *Genes Dev* 17, 348-353.
- Lee, B.L., and Barton, G.M. (2014). Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol* 24, 360-369.
- Lee, K.A., Kim, B., Bhin, J., Kim, d.H., You, H., Kim, E.K., Kim, S.H., Ryu, J.H., Hwang, D., and Lee, W.J. (2015). Bacterial uracil modulates *Drosophila* DUOX-dependent gut immunity via Hedgehog-induced signaling endosomes. *Cell Host Microbe* 17, 191-204.
- Lee, K.A., Kim, S.H., Kim, E.K., Ha, E.M., You, H., Kim, B., Kim, M.J., Kwon, Y., Ryu, J.H., and Lee, W.J. (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell* 153, 797-811.
- Lefèvre, T., de Roode, J.C., Kacsoh, B.Z., and Schlenke, T.A. (2012). Defence strategies against a parasitoid wasp in *Drosophila*: fight or flight? *Biol Lett* 8, 230-233.
- Leitão, A.B., and Sucena, É. (2015). *Drosophila* sessile hemocyte clusters are true hematopoietic tissues that regulate larval blood cell differentiation. *Elife* 4.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* 25, 697-743.
- Lenox, L.E., Perry, J.M., and Paulson, R.F. (2005). BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood* 105, 2741-2748.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J.H., Caroff, M., Lee, W.J., Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B. (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol* 4, 478-484.
- Lewandowski, D., Barroca, V., Ducongé, F., Bayer, J., Van Nhieu, J.T., Pestourie, C., Fouchet, P., Tavitian, B., and Roméo, P.H. (2010). In vivo cellular imaging pinpoints the role

of reactive oxygen species in the early steps of adult hematopoietic reconstitution. *Blood* **115**, 443-452.

Libregts, S.F., and Nolte, M.A. (2014). Parallels between immune driven-hematopoiesis and T cell activation: 3 signals that relay inflammatory stress to the bone marrow. *Exp Cell Res* **329**, 239-247.

Llano, E., Adam, G., Pendás, A.M., Quesada, V., Sánchez, L.M., Santamariá, I., Noselli, S., and López-Otín, C. (2002). Structural and enzymatic characterization of *Drosophila* Dm2-MMP, a membrane-bound matrix metalloproteinase with tissue-specific expression. *J Biol Chem* **277**, 23321-23329.

Llano, E., Pendás, A.M., Aza-Blanc, P., Kornberg, T.B., and López-Otín, C. (2000). Dm1-MMP, a matrix metalloproteinase from *Drosophila* with a potential role in extracellular matrix remodeling during neural development. *J Biol Chem* **275**, 35978-35985.

Lo Celso, C., and Scadden, D.T. (2011). The haematopoietic stem cell niche at a glance. *J Cell Sci* **124**, 3529-3535.

Luo, H., Hanratty, W.P., and Dearolf, C.R. (1995). An amino acid substitution in the *Drosophila* hopTum-I Jak kinase causes leukemia-like hematopoietic defects. *EMBO J* **14**, 1412-1420.

Lymperi, S., Ersek, A., Ferraro, F., Dazzi, F., and Horwood, N.J. (2011). Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. *Blood* **117**, 1540-1549.

Macias, H., Moran, A., Samara, Y., Moreno, M., Compton, J.E., Harburg, G., Strickland, P., and Hinck, L. (2011). SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. *Dev Cell* **20**, 827-840.

Magwire, M.M., Fabian, D.K., Schweyen, H., Cao, C., Longdon, B., Bayer, F., and Jiggins, F.M. (2012). Genome-wide association studies reveal a simple genetic basis of resistance to naturally coevolving viruses in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet* **8**, e1003057.

Makhijani, K., Alexander, B., Tanaka, T., Rulifson, E., and Brückner, K. (2011). The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. *Development* **138**, 5379-5391.

Makki, R., Meister, M., Pennetier, D., Ubeda, J.M., Braun, A., Daburon, V., Krzemień, J., Bourbon, H.M., Zhou, R., Vincent, A., *et al.* (2010). A short receptor downregulates JAK/STAT signalling to control the *Drosophila* cellular immune response. *PLoS Biol* **8**, e1000441.

Manaka, J., Kuraishi, T., Shiratsuchi, A., Nakai, Y., Higashida, H., Henson, P., and Nakanishi, Y. (2004). Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem* **279**, 48466-48476.

Mandal, L., Banerjee, U., and Hartenstein, V. (2004). Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. *Nat Genet* **36**, 1019-1023.

Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., Evans, C.J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2007). A Hedgehog- and Antennapedia-dependent niche maintains *Drosophila* haematopoietic precursors. *Nature* **446**, 320-324.

Martinek, N., Shahab, J., Saathoff, M., and Ringuette, M. (2008). Haemocyte-derived SPARC is required for collagen-IV-dependent stability of basal laminae in *Drosophila* embryos. *J Cell Sci* **121**, 1671-1680.

Martinez-Agosto, J.A., Mikkola, H.K., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2007). The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev* **21**, 3044-3060.

- Medvinsky, A., Rybtsov, S., and Taoudi, S. (2011). Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development* 138, 1017-1031.
- Milan, N.F., Kacsoh, B.Z., and Schlenke, T.A. (2012). Alcohol consumption as self-medication against blood-borne parasites in the fruit fly. *Curr Biol* 22, 488-493.
- Miller, M.R., Robinson, K.J., Cleary, M.D., and Doe, C.Q. (2009). TU-tagging: cell type-specific RNA isolation from intact complex tissues. *Nat Methods* 6, 439-441.
- Minakhina, S., Druzhinina, M., and Steward, R. (2007). Zfrp8, the *Drosophila* ortholog of PDCD2, functions in lymph gland development and controls cell proliferation. *Development* 134, 2387-2396.
- Minakhina, S., Tan, W., and Steward, R. (2011). JAK/STAT and the GATA factor Pannier control hemocyte maturation and differentiation in *Drosophila*. *Dev Biol* 352, 308-316.
- Mondal, B.C., Mukherjee, T., Mandal, L., Evans, C.J., Sinenko, S.A., Martinez-Agosto, J.A., and Banerjee, U. (2011). Interaction between differentiating cell- and niche-derived signals in hematopoietic progenitor maintenance. *Cell* 147, 1589-1600.
- Mondal, B.C., Shim, J., Evans, C.J., and Banerjee, U. (2014). Pvr expression regulators in equilibrium signal control and maintenance of *Drosophila* blood progenitors. *Elife* 3, e03626.
- Morales, J., Chiu, H., Oo, T., Plaza, R., Hoskins, S., and Govind, S. (2005). Biogenesis, structure, and immune-suppressive effects of virus-like particles of a *Drosophila* parasitoid, *Leptopilina victorae*. *J Insect Physiol* 51, 181-195.
- Morazzani, E.M., Wiley, M.R., Murreddu, M.G., Adelman, Z.N., and Myles, K.M. (2012). Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. *PLoS Pathog* 8, e1002470.
- Mortimer, N.T. (2013). Parasitoid wasp virulence: A window into fly immunity. *Fly (Austin)* 7, 242-248.
- Mortimer, N.T., Goecks, J., Kacsoh, B.Z., Mobley, J.A., Bowersock, G.J., Taylor, J., and Schlenke, T.A. (2013). Parasitoid wasp venom SERCA regulates *Drosophila* calcium levels and inhibits cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9427-9432.
- Mortimer, N.T., Kacsoh, B.Z., Keebaugh, E.S., and Schlenke, T.A. (2012). Mgat1-dependent N-glycosylation of membrane components primes *Drosophila melanogaster* blood cells for the cellular encapsulation response. *PLoS Pathog* 8, e1002819.
- Moy, R.H., and Cherry, S. (2013). Antimicrobial autophagy: a conserved innate immune response in *Drosophila*. *J Innate Immun* 5, 444-455.
- Moy, R.H., Gold, B., Molleston, J.M., Schad, V., Yanger, K., Salzano, M.V., Yagi, Y., Fitzgerald, K.A., Stanger, B.Z., Soldan, S.S., *et al.* (2014). Antiviral autophagy restricts Rift Valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity* 40, 51-65.
- Mukherjee, T., Kim, W.S., Mandal, L., and Banerjee, U. (2011). Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of *Drosophila* blood cells. *Science* 332, 1210-1213.
- Myllymäki, H., and Rämet, M. (2014). JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. *Scand J Immunol* 79, 377-385.
- Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, E., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., Somogyi, K., Kronhamn, J., Hultmark, D., and Andó, I. (2009). Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4805-4809.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.

- Nagamachi, A., Nakata, Y., Ueda, T., Yamasaki, N., Ebihara, Y., Tsuji, K., Honda, Z., Takubo, K., Suda, T., Oda, H., *et al.* (2014). Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. *PLoS One* 9, e87425.
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Fujioka, M., and Suda, T. (2014). Megakaryocytes are essential for HSC quiescence through the production of thrombopoietin. *Biochem Biophys Res Commun* 454, 353-357.
- Nam, H.J., Jang, I.H., Asano, T., and Lee, W.J. (2008). Involvement of pro-phenoloxidase 3 in lamellocyte-mediated spontaneous melanization in *Drosophila*. *Mol Cells* 26, 606-610.
- Nappi, A., Poirié, M., and Carton, Y. (2009). The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Adv Parasitol* 70, 99-121.
- Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460, 259-263.
- Neyen, C., Binggeli, O., Roversi, P., Bertin, L., Sleiman, M.B., and Lemaitre, B. (2015). The Black cells phenotype is caused by a point mutation in the *Drosophila* pro-phenoloxidase 1 gene that triggers melanization and hematopoietic defects. *Dev Comp Immunol* 50, 166-174.
- Nilsson, S.K., Johnston, H.M., and Coverdale, J.A. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 97, 2293-2299.
- Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.Y., Lu, J., Protopopov, A., and Silberstein, L.E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* 15, 533-543.
- Orkin, S.H. (2000). Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet* 1, 57-64.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). SnapShot: hematopoiesis. *Cell* 132, 712.
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., and Seya, T. (2003). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278, 49751-49762.
- Owusu-Ansah, E., and Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537-541.
- Pang, W.W., Price, E.A., Sahoo, D., Beerman, I., Maloney, W.J., Rossi, D.J., Schrier, S.L., and Weissman, I.L. (2011). Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20012-20017.
- Paradkar, P.N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J.B., and Walker, P.J. (2012). Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 18915-18920.
- Pennetier, D., Oyallon, J., Morin-Poulard, I., Dejean, S., Vincent, A., and Crozatier, M. (2012). Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3389-3394.
- Perry, J.M., Harandi, O.F., and Paulson, R.F. (2007). BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood* 109, 4494-4502.
- Perry, J.M., Harandi, O.F., Porayette, P., Hegde, S., Kannan, A.K., and Paulson, R.F. (2009). Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood* 113, 911-918.

- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R.S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N., *et al.* (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3, 687-694.
- Poirié, M., Carton, Y., and Dubuffet, A. (2009). Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. *C R Biol* 332, 311-320.
- Prendergast, A.M., and Essers, M.A. (2014). Hematopoietic stem cells, infection, and the niche. *Ann N Y Acad Sci* 1310, 51-57.
- Qiu, P., Pan, P.C., and Govind, S. (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* 125, 1909-1920.
- Ratheesh, A., Belyaeva, V., and Siekhaus, D.E. (2015). *Drosophila* immune cell migration and adhesion during embryonic development and larval immune responses. *Curr Opin Cell Biol* 36, 71-79.
- Renström, J., Istvanffy, R., Gauthier, K., Shimono, A., Mages, J., Jardon-Alvarez, A., Kröger, M., Schiemann, M., Busch, D.H., Esposito, I., *et al.* (2009). Secreted frizzled-related protein 1 extrinsically regulates cycling activity and maintenance of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 157-167.
- RIZKI, M.T., and RIZKI, R.M. (1959). Functional significance of the crystal cells in the larva of *Drosophila melanogaster*. *J Biophys Biochem Cytol* 5, 235-240.
- Rizki, R.M., and Rizki, T.M. (1990). Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8388-8392.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M., Grell, E.H. (1980). A mutant affecting the crystal cells in *drosophila-melanogaster*. *Roux. Arch. Dev. Biol.* 188, 91-99.
- Roy, P.J., Stuart, J.M., Lund, J., and Kim, S.K. (2002). Chromosomal clustering of muscle-expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 418, 975-979.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., and Brehelin, M. (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* 112 (Pt 1), 135-142.
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lippa, P., Lipford, G.B., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 34, 2541-2550.
- Schlenke, T.A., Morales, J., Govind, S., and Clark, A.G. (2007). Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog* 3, 1486-1501.
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7-25.
- Settles, E.W., and Friesen, P.D. (2008). Flock house virus induces apoptosis by depletion of *Drosophila* inhibitor-of-apoptosis protein DIAP1. *J Virol* 82, 1378-1388.
- Shelly, S., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., and Cherry, S. (2009). Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity* 30, 588-598.
- Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., Hohl, T.M., Serbina, N.V., Lipuma, L., Leiner, I., Li, M.O., Frenette, P.S., and Pamer, E.G. (2011). Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity* 34, 590-601.

- Shia, A.K., Glittenberg, M., Thompson, G., Weber, A.N., Reichhart, J.M., and Ligoxygakis, P. (2009). Toll-dependent antimicrobial responses in *Drosophila* larval fat body require Spätzle secreted by haemocytes. *J Cell Sci* 122, 4505-4515.
- Shim, J., Mukherjee, T., and Banerjee, U. (2012). Direct sensing of systemic and nutritional signals by haematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 14, 394-400.
- Shim, J., Mukherjee, T., Mondal, B.C., Liu, T., Young, G.C., Wijewarnasuriya, D.P., and Banerjee, U. (2013). Olfactory control of blood progenitor maintenance. *Cell* 155, 1141-1153.
- Shimizu, R., and Yamamoto, M. (2005). Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol* 16, 129-136.
- Simone, N.L., Bonner, R.F., Gillespie, J.W., Emmert-Buck, M.R., and Liotta, L.A. (1998). Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet* 14, 272-276.
- Sinenko, S.A., Mandal, L., Martinez-Agosto, J.A., and Banerjee, U. (2009). Dual role of wingless signaling in stem-like hematopoietic precursor maintenance in *Drosophila*. *Dev Cell* 16, 756-763.
- Sinenko, S.A., Shim, J., and Banerjee, U. (2012). Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*. *EMBO Rep* 13, 83-89.
- Small, C., Paddibhatla, I., Rajwani, R., and Govind, S. (2012). An introduction to parasitic wasps of *Drosophila* and the antiparasite immune response. *J Vis Exp*, e3347.
- Small, C., Ramroop, J., Otazo, M., Huang, L.H., Saleque, S., and Govind, S. (2014). An unexpected link between notch signaling and ROS in restricting the differentiation of hematopoietic progenitors in *Drosophila*. *Genetics* 197, 471-483.
- Socolovsky, M. (2007). Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 14, 215-224.
- Sorrentino, R.P., Melk, J.P., and Govind, S. (2004). Genetic analysis of contributions of dorsal group and JAK-Stat92E pathway genes to larval hemocyte concentration and the egg encapsulation response in *Drosophila*. *Genetics* 166, 1343-1356.
- Stofanko, M., Kwon, S.Y., and Badenhorst, P. (2010). Lineage tracing of lamellocytes demonstrates *Drosophila* macrophage plasticity. *PLoS One* 5, e14051.
- Suarez-Quian, C.A., Goldstein, S.R., Pohida, T., Smith, P.D., Peterson, J.I., Wellner, E., Ghany, M., and Bonner, R.F. (1999). Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *Biotechniques* 26, 328-335.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977-988.
- Takizawa, H., Schanz, U., and Manz, M.G. (2011). Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: mission accomplished? *Swiss Med Wkly* 141, w13316.
- Tokusumi, T., Shoue, D.A., Tokusumi, Y., Stoller, J.R., and Schulz, R.A. (2009). New hemocyte-specific enhancer-reporter transgenes for the analysis of hematopoiesis in *Drosophila*. *Genesis* 47, 771-774.
- Tokusumi, T., Tokusumi, Y., Hopkins, D.W., and Schulz, R.A. (2015). Bag of Marbles controls the size and organization of the *Drosophila* hematopoietic niche through interactions with the Insulin-like growth factor pathway and Retinoblastoma-family protein. *Development* 142, 2261-2267.
- Tokusumi, T., Tokusumi, Y., Hopkins, D.W., Shoue, D.A., Corona, L., and Schulz, R.A. (2011). Germ line differentiation factor Bag of Marbles is a regulator of hematopoietic progenitor maintenance during *Drosophila* hematopoiesis. *Development* 138, 3879-3884.

- Tokusumi, Y., Tokusumi, T., Shoue, D.A., and Schulz, R.A. (2012). Gene regulatory networks controlling hematopoietic progenitor niche cell production and differentiation in the *Drosophila* lymph gland. *PLoS One* 7, e41604.
- Trumpp, A., Essers, M., and Wilson, A. (2010). Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 10, 201-209.
- Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B., and Orkin, S.H. (1998). Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* 12, 1176-1188.
- van Rij, R.P., Saleh, M.C., Berry, B., Foo, C., Houk, A., Antoniewski, C., and Andino, R. (2006). The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 20, 2985-2995.
- Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., and Aguila, H.L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* 103, 3258-3264.
- Vlisidou, I., and Wood, W. (2015). *Drosophila* blood cells and their role in immune responses. *FEBS J* 282, 1368-1382.
- Waltzer, L., Bataillé, L., Peyrefitte, S., and Haenlin, M. (2002). Two isoforms of Serpent containing either one or two GATA zinc fingers have different roles in *Drosophila* haematopoiesis. *EMBO J* 21, 5477-5486.
- Waltzer, L., Ferjoux, G., Bataillé, L., and Haenlin, M. (2003). Cooperation between the GATA and RUNX factors Serpent and Lozenge during *Drosophila* hematopoiesis. *EMBO J* 22, 6516-6525.
- Wang, D., Paz-Priel, I., and Friedman, A.D. (2009). NF-kappa B p50 regulates C/EBP alpha expression and inflammatory cytokine-induced neutrophil production. *J Immunol* 182, 5757-5762.
- Wang, L., Sexton, T.R., Venard, C., Giedt, M., Guo, Q., Chen, Q., and Harrison, D.A. (2014). Pleiotropy of the *Drosophila* JAK pathway cytokine Unpaired 3 in development and aging. *Dev Biol* 395, 218-231.
- Wang, M.C., Bohmann, D., and Jasper, H. (2003). JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. *Dev Cell* 5, 811-816.
- Wang, X.H., Aliyari, R., Li, W.X., Li, H.W., Kim, K., Carthew, R., Atkinson, P., and Ding, S.W. (2006). RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* 312, 452-454.
- Watson, F.L., Püttmann-Holgado, R., Thomas, F., Lamar, D.L., Hughes, M., Kondo, M., Rebel, V.I., and Schmucker, D. (2005). Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science* 309, 1874-1878.
- Winkler, I.G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R.N., Forristal, C.E., Patton, J.T., Magnani, J.L., and Lévesque, J.P. (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat Med* 18, 1651-1657.
- Xia, Y., Midoun, S.Z., Xu, Z., and Hong, L. (2015). Heixuedian (heix), a potential melanotic tumor suppressor gene, exhibits specific spatial and temporal expression pattern during *Drosophila* hematopoiesis. *Dev Biol* 398, 218-230.
- Xie, J., Tiner, B., Vilchez, I., and Mateos, M. (2011). Effect of the *Drosophila* endosymbiont *Spiroplasma* on parasitoid wasp development and on the reproductive fitness of wasp-attacked fly survivors. *Evol Ecol* 53, 1065-1079.

- Xie, J., Vilchez, I., and Mateos, M. (2010). Spiroplasma bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLoS One* 5, e12149.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., *et al.* (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301, 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169, 6668-6672.
- Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., and Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell* 147, 1146-1158.
- Yang, Z., Edenberg, H.J., and Davis, R.L. (2005). Isolation of mRNA from specific tissues of *Drosophila* by mRNA tagging. *Nucleic Acids Res* 33, e148.
- Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Lippa, P.B., Schmitz, F., Haas, T., Heit, A., Bauer, S., and Wagner, H. (2006). CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *Eur J Immunol* 36, 431-436.
- Yoshiga, T., Georgieva, T., Dunkov, B.C., Harizanova, N., Ralchev, K., and Law, J.H. (1999). *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *Eur J Biochem* 260, 414-420.
- Zambon, R.A., Nandakumar, M., Vakharia, V.N., and Wu, L.P. (2005). The Toll pathway is important for an antiviral response in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7257-7262.
- Zambon, R.A., Vakharia, V.N., and Wu, L.P. (2006). RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cell Microbiol* 8, 880-889.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., *et al.* (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836-841.
- Zhou, G., and Ono, S.J. (2002). Transcriptional regulation of the BCL-6 gene: mechanistic dissection using mutant cell lines. *Mol Med* 8, 645-654.
- Zovein, A.C., and Forsberg, E.C. (2015). Hematopoietic development at high altitude: blood stem cells put to the test. *Development* 142, 1728-1732.

Remerciements

Remerciements

Faire une thèse est une épreuve difficile, que je n'aurais jamais réussie sans l'aide et le soutien constant de mon entourage. Aussi il convient de le remercier convenablement, car me supporter au quotidien (dans tous les sens du terme) n'est pas toujours une tâche aisée...

Sur le plan professionnel tout d'abord (qui au fil du temps s'est fortement mêlé au plan personnel) : le CBD est devenu au fil du temps une deuxième maison, et les membres de l'équipe une autre famille (avec des « parents » attentifs, des « frères », « sœurs », « cousins » et « tontons rigolos »...). Je tiens tout particulièrement à remercier Nathalie, qui m'a accueillie à bras ouverts dès ma 1^{ère} année de master et qui a toujours été d'un soutien sans faille depuis. Merci aussi à Michèle, également toujours présente à l'appel et une personne d'une grande humanité. Sans vous deux, je ne pense pas que j'aurai pu terminer ma thèse, et donc je vous dois un énorme merci. Je n'oublie pas non plus Alain, qui m'a souvent donné à réfléchir et dont l'avis est toujours intéressant. Merci aussi à Jean-Louis, Yannick, Laurence, Laetitia et Caroline : chacun d'entre vous m'a beaucoup apporté au cours de ces années, par les conversations que nous avons eues et par votre bonne humeur quotidienne (sans laquelle le labo aurait été beaucoup plus tristounet). Enfin, je remercie ceux qui ont été mes « co-détenus » (c'est-à-dire les autres étudiants du labo ^^) : Anurag, Mathilde, Ismaël, Manon et Alex. Chacun d'entre vous est une très belle rencontre, et votre présence au labo a été un grand réconfort et une bonne raison de se lever pour aller bosser ! Je vous souhaite à tous un bel avenir et je vous remercie d'avoir contribué à ce que je réalise le mien.

Il me faut également remercier les autres membres du CBD : en premier lieu les thésards bien sûr, avec qui nous avons lié de nombreux liens d'amitié qui vont j'en suis sûre se maintenir après la thèse, quels que soient les endroits où on se retrouvera tous (vive la technologie : promis un jour je m'achèterai un smartphone). Donc merci à Luis, Julien, Camille, Manon, Dorian, Marion, Fred, Jérôme et tous ceux que je n'ai pas cités mais à qui je pense (la liste est longue, et j'ai la flemme de réfléchir). Merci aussi à Aude, Angie, Charlotte, Mohamad, David et Valérie, qui ne sont pas officiellement des « thésards CBD » mais qui font partie des belles rencontres que j'ai faites au labo. Le labo sans vous tous c'est un peu comme des

spaghettis sans fromage râpé (et quand on connaît mon amour pour les pâtes, on se rend compte que cette magnifique métaphore est un gros compliment). Merci aussi aux autres membres du labo, avec une pensée particulière pour Fabienne, qui s'intéresse réellement au travail et à l'avancée de chacun, ce qui est extrêmement appréciable.

Sur un plan plus personnel, je voudrais remercier ma famille pour leur soutien et leur présence au quotidien. Mes parents, mes grands-parents, Benjamin, Stéphanie et Christian ainsi que leurs deux petits bouts, Timothé et Eloïse (je vous épargne les oncles, tantes, cousins et cousines mais je pense à eux quand même) ont tous une place particulière dans ma vie et sont toujours d'un grand réconfort. Merci aussi à mes amis « hors labo » (parce que oui, ça existe !!), en particulier Sophie, Daphné, Tomaroni, Stef et Amélie, pour tous les bons moments qu'on passe ensemble.

Et enfin (vous l'attendiez, le voici-le voilà) : un très gros merci à Thomas, qui est la preuve vivante qu'on fait des très belles rencontres au labo. Toi et moi on est allé au bout du monde ensemble, et ça ne fait que commencer...

Drosophila response to wasp parasitism : role of the Toll/NFκB signalling pathway

Abstract

In all organisms, the immune response is divided into two parts: the humoral response, which consists of producing a large number of molecules to combat the pathogen, and the cellular response, which relies on immune cells produced during hematopoiesis. In adult mammals, hematopoiesis occurs in the bone marrow, where a particular microenvironment called the “hematopoietic niche” controls self-renewal, proliferation and differentiation of Hematopoietic Stem Cells (HSCs), which give rise to all blood cell types. Following a pathogenic infection, the hematopoietic system’s homeostasis is modified in order to obtain an adapted cellular immune response. The role that the hematopoietic niche plays during an immune response remains unclear.

Drosophila is used as a model system to study *in vivo* hematopoiesis and the immune response. In *drosophila*, hematopoiesis occurs at the larval stage in a specialized organ called the Lymph Gland (LG). Within this organ, a small group of cells termed the Posterior Signalling Center (PSC), controls the balance between hematopoietic progenitors and differentiated immune/blood cells, a role similar to the mammalian hematopoietic niche. Following an immune challenge, especially in response to wasp parasitism, a massive differentiation of specific immune cells called lamellocytes occurs in the LG. The LG subsequently disperses to release lamellocytes into the hemolymph. During parasitism, the wasp lays an egg in the *drosophila* larva. In the absence of a cellular immune response, the wasp egg will develop and kill its host. By forming a capsule around the wasp egg, lamellocytes impede the pathogen’s development and permit the host’s survival.

During my PhD, I studied the *drosophila* larva cellular immune response to wasp parasitism. I focused my research on the role of the “hematopoietic niche”. I therefore initiated a transcriptomic study, in order to identify genes expressed by the PSC in response to parasitism. In parallel, I characterized the role of the Toll/NFκB signalling pathway in the LG during parasitism. The Toll/NFκB pathway plays a key role in the humoral response both in *drosophila* and mammals; however its role in the cellular immune response remains unknown. My results indicate that the Toll/NFκB pathway is activated in the PSC following parasitism. Its activation is mediated by the NFκB transcription factor « Dorsal-related Immunity Factor » (Dif), which is required in the PSC for rapid lamellocyte production and LG dispersion. Furthermore, I established the existence of a genetic network comprising the Toll/NFκB and EGFR signalling pathways and Reactive Oxygen Species (ROS), in order to control the immune response to parasitism. An increase in ROS levels in the PSC and EGFR pathway activation in the immune cells, have been described as required for wasp egg encapsulation. My data suggest that the ROS and the EGFR pathway are also required for LG dispersion following wasp parasitism, in PSC cells and in hematopoietic progenitors, respectively. Based on the high conservation of signalling pathways and molecular processes controlling hematopoiesis, my results raise the question of whether such a network is conserved in the mammalian hematopoietic niche in response to pathogenic infections.

Key words: 1. *drosophila* 2. immune response 3. parasitism 4. hematopoiesis

Réponse au parasitisme par des guêpes chez la drosophile : rôle de la voie de signalisation Toll/NFκB

Résumé

Dans tous les organismes animaux la réponse immunitaire est divisée en deux composantes : la réponse humorale, qui consiste en la production d'un grand nombre de molécules toxiques pour le pathogène, et la réponse cellulaire, qui met en jeu des cellules immunitaires produites lors de l'hématopoïèse. Chez les mammifères adultes, l'hématopoïèse se déroule dans la moelle osseuse, où un microenvironnement particulier appelé « niche hématopoïétique » contrôle l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines/immunitaires. Suite à une infection par un pathogène, l'homéostasie du système hématopoïétique est modifiée, afin de permettre la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire adaptée. Le rôle de la niche hématopoïétique dans le contrôle de l'hématopoïèse suite à une infection reste à ce jour mal connu. La drosophile est utilisée comme système modèle pour étudier *in vivo* l'hématopoïèse et la réponse immunitaire. L'hématopoïèse a lieu chez la drosophile au stade larvaire dans un organe spécialisé appelé Glande Lymphatique (GL). Au sein de cet organe, un petit groupe de cellules, le Centre de Signalisation Postérieur (PSC), contrôle l'équilibre entre progéniteurs hématopoïétiques et cellules immunitaires différenciées, et a donc un rôle équivalent à celui de la niche hématopoïétique des mammifères. Suite à un stress immun, tel que le parasitisme par des guêpes, une différenciation massive de cellules immunitaires spécifiques, les lamellocytes, a lieu dans la GL; puis la dispersion de la GL permet la libération des lamellocytes dans la circulation lymphatique. Lors du parasitisme, la guêpe pond un œuf dans le corps de la larve de drosophile. En absence de réponse immunitaire cellulaire, l'œuf de guêpe se développe au dépend de son hôte, entraînant sa mort. En formant une capsule autour de l'œuf de guêpe, les lamellocytes neutralisent son développement et permettent la survie de l'hôte.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la réponse immunitaire cellulaire de la larve de drosophile au parasitisme par des guêpes. Je me suis plus particulièrement intéressée au rôle de la « niche hématopoïétique » dans cette réponse. Pour cela, j'ai initié une approche transcriptomique ayant pour but d'identifier les gènes spécifiquement exprimés dans le PSC en réponse au parasitisme. En parallèle, j'ai caractérisé le rôle de la voie de signalisation Toll/NFκB dans la GL lors de la réponse au parasitisme. La voie Toll/NFκB joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire humorale et son rôle dans la réponse immunitaire cellulaire reste à définir. Mes travaux indiquent que la voie Toll/NFκB est activée dans le PSC suite au parasitisme. Son activation est médiée par le facteur de transcription NFκB «Dorsal-related Immunity Factor» (Dif), qui est requis dans le PSC pour permettre la différenciation rapide et massive de lamellocytes et la dispersion des cellules de la GL. De plus, j'ai établi un réseau génique, impliquant les deux voies de signalisation Toll/NFκB et EGFR ainsi que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le contrôle de la réponse au parasitisme. Une augmentation du niveau de ROS dans le PSC et l'activation de la voie EGFR dans les cellules immunitaires ont été décrits comme nécessaires à l'encapsulation des œufs de guêpe après parasitisme. Mes données établissent qu'ils sont en plus requis respectivement dans les cellules du PSC et dans les progéniteurs hématopoïétiques pour permettre la dispersion de la GL après parasitisme. Basé sur la forte conservation des voies de signalisation et processus moléculaires contrôlant l'hématopoïèse entre les mammifères et la drosophile, mes résultats posent la question de la conservation du réseau génique établi chez la drosophile et du rôle de la voie NFκB dans la niche hématopoïétique des mammifères lors d'une réponse à une infection.

Mots clés: 1. drosophile 2. réponse immunitaire 3. parasitisme 4. hématopoïèse